

Université de Montréal

**Études sur les mécanismes de la réduction de l'influx de calcium dans les muscles  
lisses vasculaires durant la grossesse chez la rate**

par

Bertrand ROY

Pharmacologie  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiae Doctorae (PhD)  
en Pharmacologie

4, 2000

© Bertrand ROY, 2000



W  
4  
U58  
2000  
V.073

Université de Montréal

Étudier sur les mécanismes de la réduction de l'influx de calcium dans les muscles  
lorsque vasodilatés durant la grossesse chez la rate

Bernard ROY

Pharmacologie  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maîtrise en Pharmacie (M.Ph.)  
en Pharmacie

4,2000



© Bernard ROY 2000

Page d'identification du jury

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**Études sur les mécanismes de la réduction de l'influx de calcium dans les muscles  
lisses vasculaires durant la grossesse chez la rate**

présenté par:

Bertrand ROY

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Martin G. SIROIS président rapporteur  
Éric THORIN membre du jury  
Richard LARIVIÈRE membre du jury  
Jean ST-LOUIS membre du jury

Thèse acceptée le: 13 Avril 2000

## Sommaire

La grossesse s'accompagne d'une réponse pressive diminuée aux stimuli d'agents vasoactifs. Les mécanismes responsables de ce changement demeurent peu connus. Afin de mieux les comprendre, nous avons évalué la dépendance du muscle lisse vasculaire au calcium extracellulaire lors de sa contraction. Plus spécifiquement, nous avons mesuré la fonction des canaux calciques dépendants du voltage, voie d'entrée importante de calcium extracellulaire, sur des anneaux aortiques de rates gestantes à terme et des rates vierges servant de témoins.

Dans un premier temps, différentes concentrations de calcium extracellulaire ont été utilisées afin de mesurer les réponses contractiles à la phényléphrine, un agoniste  $\alpha$ -adrénergique. L'effet maximal de la phényléphrine diminue significativement en présence de 0.5 mM et 0.25 mM de calcium dans la solution physiologique chez les témoins. Par contre, chez les gestantes, cette diminution n'apparaît qu'en présence de 0.25 mM de calcium. Ces résultats suggèrent une sensibilité diminuée des vaisseaux sanguins au calcium extracellulaire au cours de la grossesse. Les contractions des anneaux à la phényléphrine, mesurées en l'absence de calcium dans la solution physiologique, s'avèrent plus importantes chez la rate gestante que chez la rate vierge. Ces réponses sont pratiquement absentes chez les deux groupes d'animaux lorsque le KCl, un agent dépolarisant, est utilisé comme stimulant.

Dans un deuxième temps, l'effet de différents bloqueurs de canaux calciques a été étudié sur des anneaux aortiques de rates gestantes et vierges. Le D-600, un bloqueur de canaux calciques de la famille des phénylalkylamines, inhibe les réponses au  $\text{CaCl}_2$  dans les deux groupes d'anneaux étudiés. Il induit une inhibition de

la réponse à la phényléphrine et au KCl proportionnellement à sa concentration dans le milieu physiologique. Cependant, son effet est moins prononcé sur les tissus provenant des rates gestantes que ceux des vierges et ce pour les deux agonistes. La cinnarizine, un bloqueur de canaux calciques, de type pipérazine, est, pour sa part, plus efficace pour bloquer les réponses contractiles au KCl et à la phényléphrine sur les anneaux aortiques provenant de rates vierges par rapport aux anneaux de rates gestantes.

Troisièmement, l'effet de bloqueurs de la phosphodiesterase a été évaluée. L'amrinone, décrite comme un bloqueur des canaux calciques opérés par un récepteur, bloque aussi la phosphodiesterase et engendre une réduction similaire de la contraction maximale à la phényléphrine et au KCl dans les deux groupes étudiés. L'IBMX (1-méthyl-3-isobutylxanthine), un inhibiteur non-spécifique de la phosphodiesterase, s'avère moins apte à diminuer la contraction à la PhE sur les anneaux aortiques de rates gestantes que de rates vierges.

Finalement, les taux de captation de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  ont été investigués. La captation de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , lorsque mesurée à différents temps, en absence ou en présence d'une stimulation, montre une diminution sur les anneaux aortiques de rates gestantes en comparaison à ceux des rates vierges. Par ailleurs, quand les compartiments intracellulaires de calcium sensibles à la phényléphrine sont vidés, leur remplissage est retardé dans les aortes de rates gestantes. Enfin, la captation de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  des deux groupes de tissus, avec ou sans AVP ( $^8\text{arg-vasopressine}$ ), n'est pas significativement diminuée. Par contre, l'amrinone induit une diminution de captation de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  sur les tissus de rates vierges mais non sur ceux de rates gestantes lorsque la phényléphrine (1  $\mu\text{mol/L}$ ) est utilisée.

L'ensemble de ces résultats démontre une diminution de l'influx de calcium extracellulaire dans la cellule musculaire lisse vasculaire; résultat d'une possible diminution de l'activité des canaux calciques dépendants du voltage. De plus, nos résultats suggèrent que des mécanismes contrevenants à la contraction semblent inhibés lors de la gestation chez la rate.

**Mots clés:** muscle lisse vasculaire, calcium, contraction, gestation, nifédipine, Bay K 8644, cinnarizine, dihydropyridine, phosphodiesterase.

## TABLE DES MATIÈRES

PAGE DE PRÉSENTATION .....	i
PAGE D'IDENTIFICATION DU JURY .....	ii
SOMMAIRE .....	iii
TABLE DES MATIÈRES .....	vi
LISTE DES FIGURES .....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	xii
1. INTRODUCTION .....	2
1.1 Changements hémodynamiques lors de la grossesse.....	2
1.1.1 Peptides vasoactifs dans la grossesse .....	4
1.1.2 Contrôles de la vasoconstriction .....	6
1.1.3 Hypertensions de grossesse .....	10
1.2 Réactivité vasculaire lors de la gestation .....	11
1.2.1 Systémique .....	12
1.2.1.1 Changements morphologiques.....	12
1.2.1.2 Contraction.....	13
1.2.1.3 Relaxation.....	15
1.3 Le vaisseau sanguin .....	16
1.3.1 Structures des vaisseaux sanguins.....	16
1.3.1.1 Adventice .....	16
1.3.1.2 Média .....	16
1.3.1.3 Intima .....	17

1.4	Contraction et relaxation musculaire lisse .....	18
1.4.1	Mécanismes de la contraction .....	18
1.4.2	Mécanismes de la relaxation .....	22
1.5	Mobilisation du calcium extracellulaire par la cellule musculaire lisse vasculaire .....	24
1.5.1	Canaux calciques dépendants du voltage. ....	24
1.5.1.1	Généralités .....	24
1.5.2	Canaux calciques opérés par un récepteur.....	32
1.6	Types de canaux calciques dépendants du voltage .....	33
1.6.1	Canaux calciques de type B.....	33
1.6.2	Canaux calciques de type N. ....	34
1.6.3	Canaux calciques de type T.....	34
1.6.4	Canaux calciques de type P. ....	35
1.6.5	Canaux calciques de type L.....	36
1.7	Structure des canaux calciques dépendants du voltage.....	38
1.7.1	La sous-unité $\alpha_1$ .....	38
1.7.2	La sous-unité $\alpha_2/\delta$ . ....	42
1.7.3	La sous-unité $\beta$ .....	43
1.7.4	La sous-unité $\gamma$ .....	44
1.8	Agents pharmacologiques modulateurs des canaux calciques de type L.....	44
1.8.1	Dihydropyridines:.....	44
1.8.2	Benzothiazépines:.....	46
1.8.3	Phénylalkylamines:.....	46



1.9 Objectifs du présent travail .....	47
2. ARTICLE 1 .....	50
3. ARTICLE 2 .....	92
4. Discussion générale .....	128
5. Références .....	143
6. REMERCIEMENTS .....	xiv

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b>	Les principaux systèmes mobilisant le calcium de la cellule musculaire lisse .....	20
<b>Figure 2:</b>	Structure du canaux calciques dépendant du voltage de type L de muscle squelettique .....	26
<b>Figure 3:</b>	Fonction des canaux calciques dépendant du voltage .....	30
<b>Figure 4:</b>	Cartographie fonctionnelle de la sous-unité $\alpha_1$ .....	40

## Article 1

<b>Figure 1:</b>	Effet de l'absence de $\text{Ca}^{2+}$ et de la réintroduction de $\text{Ca}^{2+}$ sur des anneaux aortiques de rates vierges et gestantes préstimulés à la phényléphrine .....	86
<b>Figure 2:</b>	Courbes concentration-réponse au $\text{CaCl}_2$ sur des anneaux aortiques de rates vierges et gestantes préstimulés à la phényléphrine et au KCl en l'absence et en présence de D-600 .....	87
<b>Figure 3:</b>	Courbes concentration-réponse à la phényléphrine et au KCl sur des anneaux aortiques de rates vierges et gestantes en présence de différentes concentrations de D-600 .....	88
<b>Figure 4:</b>	Captation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ basale et stimulée sur des anneaux aortiques de rates vierges et gestantes .....	89

<b>Figure 5:</b>	Captation basale et stimulée (100 mmol/L KCl) de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ à différents temps sur des anneaux aortiques de rates vierges et gestantes .....	90
<b>Figure 6:</b>	Captation basale de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ à différents temps sur des anneaux aortiques de rates vierges et gestantes suite au vidange des compartiments intracellulaires de calcium sensibles à la phényléphrine .....	91
<b>Figure 7:</b>	Liaison basale et stimulée (100 mmol/L KCl) de [ $^3\text{H}$ ]-isradipine à différents temps sur des anneaux aortiques de rates vierges et gestantes .....	92

## Article 2

<b>Figure 1:</b>	Courbes concentration-réponse à la phényléphrine sur des anneaux aortiques de rates vierges et gestantes en présence de différentes concentrations de calcium extracellulaire .....	125
<b>Figure 2:</b>	Courbes concentration-réponse à la phényléphrine et au KCl sur des anneaux aortiques de rates vierges et gestantes en présence de différentes concentrations de cinnarizine .....	126
<b>Figure 3:</b>	Courbes concentration-réponse à la phényléphrine sur des anneaux aortiques de rates vierges et gestantes en présence de différentes concentrations d'amrinone .....	127

- Figure 4:** Courbes concentration-réponse à la phényléphrine sur des anneaux aortiques de rates vierges et gestantes en présence de différentes concentrations d'IBMX..... 128
- Figure 5:** Captation basale et stimulée ( $1 \times 10^{-6}$  mmol/L phényléphrine et 60 mmol/L KCl) de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en présence d'amrinone sur des anneaux aortiques de rates vierges et gestantes ..... 129

## Liste des abréviations

[ <sup>3</sup> H]-nitrendipine	: nitrendipine tritiée
[ <sup>3</sup> H]-isradipine	: isradipine tritiée
ADN <sub>c</sub>	: acide désoxyribonucléique complémentaire
AMP <sub>c</sub>	: adénosine monophosphate cyclique
ANOVA	: analyse de variance
ANP	: facteur natriurétique de l'oreillette
ARN <sub>m</sub>	: acide ribonucléique messenger
ATP	: adénosine triphosphate
Bay K 8644	: 1,4-Dihydro-2,6-diméthyl-5-nitro-4-[2-(trifluorométhyl)- phenyl]-3-pyridine carboxylic acid methyl ester
B <sub>max</sub>	: densité des récepteurs
CaCl <sub>2</sub>	: chlorure de calcium
DAG	: diacylglycérol
EC <sub>50</sub>	: concentration produisant 50% de l'effet maximum
EDRF	: facteur relaxant de l'endothélium
et al.	: et collaborateurs
g	: gramme
g	: gravité
GMP	: guanosine monophosphate
GMP <sub>c</sub>	: guanosine monophosphate cyclique
GTP	: guanosine triphosphate

IBMX	:	3-isobutyl-1-methylxanthine
InsP <sub>3</sub>	:	inositol-1,4,5-triphosphate
KCl	:	chlorure de potassium
K <sub>d</sub>	:	constante de dissociation
kDa	:	kilodalton
L-NAME	:	N <sup>o</sup> -nitro-L-arginine methyl ester
M	:	molaire
mL	:	millilitre
mM	:	millimolaire
mmHg	:	millimètres de mercure
mV	:	millivolt
nM	:	nanomolaire
NO	:	monoxyde d'azote
PCR	:	réaction de polymérase en chaîne
pD <sub>2</sub>	:	logarithme négatif de la concentration produisant 50% de la réponse maximale
PIP <sub>2</sub>	:	L- $\alpha$ -phosphatidil inositol biphosphate
protéine G	:	protéine liant le GTP
pS	:	picoSiemens
ROC	:	canaux calciques opérés par un récepteur
$\mu$ g	:	microgramme
$\mu$ M	:	micromolaire

# INTRODUCTION

## 1. INTRODUCTION

La grossesse est une condition physiologique qui fait l'objet de peu de travaux scientifiques si on considère sa médicalisation dans la société occidentale. En effet, la gestation, autant chez la femme que chez les autres mammifères, est associée à de nombreux changements physiologiques dont les mécanismes de mise en place ne sont à peu près pas connus. Notre travail vise à comprendre les mécanismes des importants changements cardiovasculaires associés à une grossesse normale.

### 1.1 *Changements hémodynamiques lors de la grossesse chez les femmes*

Chez des femmes normales recrutées avant la grossesse, le rythme cardiaque, le volume diastolique, le volume d'éjection systolique augmentent et la résistance vasculaire systémique diminue lorsque gravide (18). Ces changements surviennent au début de la grossesse (8 premières semaines) et sont maintenus jusqu'à la fin de celle-ci. En général, le rythme cardiaque augmente d'environ de 10 à 15 battements par minute pendant la grossesse. Le volume cardiaque augmente d'environ 75 mL soit un peu plus de 10% entre le début et la fin de la grossesse. De plus, la pression artérielle et la résistance vasculaire diminuent, tandis que le volume sanguin, le poids maternel et le taux du métabolisme basal augmentent. Le volume d'éjection systolique, au repos, augmente appréciablement tôt dans la grossesse et reste élevé tout au long de celle-ci.

Le volume sanguin maternel commence à augmenter pendant le premier trimestre et atteint un plateau lors du troisième. Ceci résulte d'une augmentation du



plasma et des érythrocytes. En effet, le mécanisme habituel comporte une augmentation initiale du volume plasmatique suivi d'une hausse du volume érythrocytaire. La production d'érythropoïétine augmente de 2 à 3 fois au 2<sup>e</sup> trimestre (160). La pression sanguine, quant à elle, chute plus spécifiquement vers la fin du premier trimestre, se maintient basse au long du deuxième trimestre, et remonte graduellement aux valeurs d'avant grossesse lors du troisième trimestre (108). La cause et les mécanismes amenant ces modifications restent encore à être élucidés.

Hart *et al.* (58) ont démontré que le rythme cardiaque, la compliance et l'élasticité de l'aorte sont tous plus grands à la fin du troisième trimestre qu'après l'accouchement. De plus, la compliance aortique était significativement plus grande chez les femmes nullipares lors de la grossesse que chez les femmes multipares dans les mêmes conditions. Elle était équivalente après l'accouchement entre les deux groupes. Katz *et al.* (78) ont trouvé une diminution significative de la pression diastolique lors de la grossesse, alors que Hart *et al.* (58) n'ont pas fait cette observation.

Il y a peu d'information disponible sur le rôle joué par les modifications structurelles de l'aorte pendant la grossesse. La pression diastolique diminue durant la grossesse, un changement qui pourrait être associé avec une augmentation du diamètre aortique (58). En effet, une étude échographique de Katz *et al.* (78) a démontré une augmentation constante du diamètre aortique à la diastole pendant la grossesse tandis que la pression diastolique diminue. Ils suggèrent des mécanismes pouvant amener ces changements:

- Une augmentation de 40% du volume sanguin chez la femme enceinte à terme pourrait augmenter la dimension aortique ainsi que sa compliance

- La possibilité d'une réduction du tonus  $\alpha$ -adrénergique durant la grossesse
- Les stéroïdes sexuels pourraient jouer un rôle prédominant dans les altérations aortiques durant la grossesse par des effets directs et indirects.

Une augmentation du diamètre aortique combinée à une augmentation de sa compliance (sa capacité à l'étirement) diminue la post charge dans l'aorte. De plus, la diminution de la réactivité vasculaire aux agents vasoconstricteurs contribuent tous à diminuer, temporairement, la pression diastolique (58). Des études, résumées dans l'article de Burnstock et Ralevic (17a), ont démontré que des gros vaisseaux artériels tels que l'artère de la queue de rat, l'artère basilaire du chien ainsi que d'autres gros conduits sont, en partie, sous influence d'une innervation sympathique. L'estradiol change la biosynthèse du collagène autour des cellules musculaires lisses en diminuant sa production et en changeant le ratio de procollagène Type I/Type II vers le Type II (6). De plus, l'estradiol stimule la synthèse de prostaglandines et de prostacyclines dans les cellules musculaires lisses aortiques (23).

### *1.1.1 Peptides vasoactifs dans la grossesse*

Plusieurs hormones endogènes viennent influencer les réponses aux vasoconstricteurs lors de la grossesse. La relaxine humaine est une protéine composée de deux chaînes (A et B) de longueur équivalente en acides aminés et produite par le corps jaune. Son rôle au cours de la grossesse n'a pas été clairement défini. Cette hormone n'est pas indispensable au maintien de la grossesse humaine (16). Elle provoque une relaxation utérine durant la gestation chez la rate par un mécanisme similaire à celui des agents  $\beta$ -adrénergique. Plus spécifiquement, la relaxine semble agir

sur un récepteur de la membrane cellulaire. Elle ferait augmenter l'adénylate cyclase qui fait augmenter à son tour l'AMPc intracellulaire ce qui amène une relaxation utérine (133).

Le peptide natriurétique de l'oreillette (ANP) est sécrété par les cardiomyocytes de l'oreillette. La forme active du peptide serait la forme  $\alpha$  (132). Ce peptide produit une natriurèse et une diurèse importante chez les humains en plus d'induire une augmentation du flot rénal et du taux de filtration glomérulaire et une diminution de la sécrétion de rénine (17). Il a aussi été démontré qu'il inhibe la sécrétion d'aldostérone stimulée par l'angiotensine II dans la zone glomérulée de la surrénale (3) et possède un effet relaxant sur le muscle lisse vasculaire stimulé par l'angiotensine II ou la noradrénaline. Ainsi, ce peptide semble agir comme antagoniste fonctionnel aux stimuli vasoconstricteurs endogènes (81). Une augmentation du volume plasmatique et de l'étirement auriculaire amène une augmentation de sa sécrétion. Celle-ci se produit aussi en présence de diètes élevées en sel mais est diminuée lorsque les diètes sont faibles en sel. Thomsen *et al.* (152) ont démontré une diminution du p-ANP (pro-ANP) plasmatique au cours du troisième trimestre chez la femme enceinte. Ceci est un des mécanismes par lequel le volume sanguin est augmenté et maintenu tout au long de la grossesse. La relation compétitive qu'a l'ANP avec le système rénine-aldostérone à contrôler l'équilibre de sodium et le volume de fluide est préservé lors de la grossesse (152).

La réponse à l'angiotensine II ainsi que le système rénine-angiotensine-aldostérone sont très altérés lors de la grossesse. Chez les femmes enceintes normotendues, il y a des augmentations marquées dans la concentration de rénine

plasmatique, de l'activité de la rénine, du substrat de la rénine, de l'angiotensine II et de l'aldostérone. Par contre, l'effet presseur à l'infusion d'angiotensine II est diminué (24). La résistance à l'effet de l'angiotensine II lors de la grossesse normale est probablement une conséquence de l'adaptation des vaisseaux.

L'endothélium vasculaire produit des substances vasoconstrictrices qui pourraient être cruciales aux adaptations hémodynamiques lors de la grossesse. Il a été démontré qu'il sécrète l'endothéline, un peptide possédant des fortes propriétés vasoconstrictrices (164). Benigni *et al.* (7) ont observé une augmentation de la synthèse de l'ARN messager de l'endothéline lors du 2<sup>e</sup> trimestre de la grossesse dans le tissu placentaire. Cette augmentation ne s'est pas traduite par une augmentation significative des taux circulants d'endothéline lors de la grossesse. Elle pourrait agir à son site de production comme régulateur local du flot sanguin. Une diminution de la pression sanguine lors de la grossesse pourrait être attribuée en partie aux changements de la synthèse de substances vasoconstrictrices de l'endothélium. De plus, l'endothélium est une structure relâchant des substances qui pourraient régir la synthèse de prostacycline et de prostaglandine E<sub>2</sub> (165).

### 1.1.2 Contrôles de la vasoconstriction

Furchgott *et al.* (107) ont démontré que l'endothélium vasculaire joue un rôle important dans le maintien du tonus vasculaire. En effet, lorsqu'on enlève cette monocouche cellulaire tapissant la lumière des vaisseaux, on prévient la relâche d'un agent causant une relaxation musculaire. Ils ont nommé cet agent "endothelium derived relaxing factor" (EDRF). Subséquemment, l'EDRF s'est avéré être le monoxyde d'azote

(NO) car ces deux substances possèdent des caractéristiques biochimiques très similaires (71;120). Le NO possède une très courte demi-vie et peut facilement diffuser à travers les membranes cellulaires. Il active la guanylate cyclase soluble dans le cytosol, contribuant ainsi à augmenter la concentration intracellulaire en GMPc (2). Ce second messager active ensuite des protéines kinases menant à la déphosphorylation des chaînes légères de myosine amenant une relaxation du muscle lisse vasculaire (1). Le NO est produit par l'oxydation de la L-arginine par trois isoformes de la NO-synthase (NOS) (163). Deux de ces isoformes sont exprimées constitutivement: la NOS endothéliale (eNOS) et la NOS neuronale (nNOS). La troisième isoforme est inductible (iNOS) et, lorsqu'induite, produit une grande quantité de NO (163). Dans les vaisseaux sanguins, on retrouve surtout la eNOS. Cette dernière est toujours active et produit un niveau basal de NO. La forme nNOS se retrouve surtout au niveau neuronal. L'isoforme inductible de la NOS se retrouve dans les deux types de tissus. Elle est induite par une pression de cisaillement augmentée (*shear stress*) dans le vaisseau sanguin.

McLaughlin *et al.* (94) ont mesuré les taux d'excrétion de GMPc à différents temps lors de la grossesse. Une augmentation significative de ces taux était détectable au septième jour de la gestation chez la rate. L'excrétion maximale était atteinte au 13<sup>e</sup> jour et maintenue jusqu'à la fin de la gestation. L'excrétion de métabolites stables du monoxyde d'azote (NO) était augmenté au cours de la gestation chez la rate (94).

Des artères de résistances (artères mésentériques) sont souvent utilisées pour représenter la circulation responsable du maintien de la pression sanguine. Les

artères mésentériques étaient moins sensibles à la phényléphrine chez les rates gestantes que non gestantes (94). Lorsque l'endothélium est enlevé, la sensibilité des vaisseaux à la phényléphrine augmente. Il est donc clair que l'endothélium intervient dans le contrôle de la réactivité vasculaire. Par contre, ces résultats n'indiquent pas une différence plus marquée chez les rates gestantes. En effet, St-Louis et Sicotte (143) ont observé que la destruction de l'endothélium de l'aorte ne modifie pas la réponse aux agents vasoconstricteurs tant chez la gestante que la non-gestante. McLaughlin *et al.* (94) a aussi utilisé du N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginine Methyl Ester (L-NAME), un inhibiteur de la NO-synthase, avec des résultats semblables à l'enlèvement de l'endothélium. Williams *et al.* (161) ont démontré une capacité plus grande du N<sup>G</sup>-Nitro-L-Monométhyl Arginine (L-NMMA), un autre inhibiteur de la NO-synthase, à diminuer le flot sanguin de la main de femmes enceintes. Cet effet était plus prononcé chez les femmes enceintes que non enceinte. Cette technique permet de mesurer par des méthodes non invasives le tonus vasculaire chez l'humain. Xu *et al.* (163) ont observé une augmentation marquée de l'expression de la eNOS dans l'aorte et les artères mésentériques de rates gestantes comparé aux non gestantes. Malgré ces observations, Magness *et al.* (92) n'ont pas démontré une augmentation du contenu cellulaire de GMPc dans les artères systémique des brebis gestantes. Beaucoup de travaux doivent encore être exécutés afin d'éclaircir le rôle de l'endothélium et du NO sur la modulation de la réactivité vasculaire dans la grossesse.

Certaines prostaglandines sont de puissantes vasodilatatrices dans différents organes. Ces dérivés lipidiques vasoactifs sont aussi impliqués dans le contrôle de la pression sanguine. Terragano *et al.* (151) ont rapporté que, tard dans la

gestation chez la chienne, le flot sanguin utérin était relié à la concentration de prostaglandines  $E_2$  dans le sang veineux. La diminution de réponse à l'infusion d'angiotensine II habituellement observée lors de la grossesse normale pourrait être régie en partie par des substances apparentées aux prostaglandines qui sont produites *in situ* par l'endothélium des artères. Une diminution du taux de synthèse des prostaglandines ou une augmentation de leur taux de catabolisme pourraient donc se traduire en une augmentation de la réponse à l'angiotensine II; une caractéristique de la femme susceptible à faire de l'hypertension de grossesse. La probabilité de l'implication des prostaglandines dans le contrôle de la réactivité vasculaire lors de la grossesse est aussi supportée par Broughton-Pipkin *et al.* (125). Ces derniers ont infusé de la prostaglandine  $E_2$  de façon intraveineuse chez des femmes et ont démontré que la quantité d'angiotensine II nécessaire pour augmenter la pression artérielle de 20 mmHg (seuil significatif expérimental) suite à cette infusion était augmentée durant la grossesse.

D'autres facteurs semblent participer à la modulation de la réponse vasculaire à l'angiotensine II pendant la grossesse. Gant *et al.* (43) ont observé que les femmes perdaient leur diminution de réponse à l'angiotensine II tôt après l'accouchement. Cet état réfractaire était retrouvé après l'administration intraveineuse du métabolite de la progestérone, le  $5\alpha$ -dihydroprogestérone. Un mécanisme impliquant la progestérone pourrait moduler la réponse vasculaire aux prostaglandines suite à une stimulation par l'angiotensine II.

### 1.1.3 Hypertensions de grossesse

En plus des raisons purement scientifiques qui justifient la quête de connaissances sur les mécanismes du contrôle hémodynamique durant la grossesse normale, une condition clinique, constituant un risque pour la vie de la mère et du fœtus, nécessite la compréhension des altérations du contrôle vasculaire accompagnant la grossesse, c'est la prééclampsie. Cette condition spécifique à la race humaine est une des graves complications se produisant dans la deuxième moitié de la grossesse chez la femme. Contrairement à la grossesse normale, la prééclampsie est caractérisée par une forte hausse de la pression diastolique pouvant atteindre plus de 110 mmHg. De plus, elle s'accompagne d'une protéinurie de plus de 300 mg/24 heures et, quelques fois, de la coagulation intravasculaire dissiminée et des problèmes hépatiques. Le volume d'éjection systolique est diminué ainsi que la capacité à excréter le sodium, ce qui peut amener de l'œdème (87). La vasculature de la femme souffrant de prééclampsie est très sensible aux vasopresseurs endogènes et exogènes, comme l'angiotensine II. De plus, l'activité du système rénine-angiotensine, normalement accrue durant la grossesse normale, semble être atténuée lors de la prééclampsie (87).

Les niveaux d'endothéline-1 ont été mesurés chez 3 groupes de femmes: des femmes enceintes à terme, en travail et prééclamptiques avant traitement (93). Les niveaux sanguins d'endothéline-1 étaient élevés lors du travail. Les femmes enceintes souffrant de prééclampsie avaient des niveaux sanguins de ce composé plus élevé avant le traitement au magnésium. De plus, le sang veineux du cordon ombilical des prééclamptiques contenait 10 fois les niveaux d'endothéline-1 de celui des grossesses normales. Une étude de Moromizato *et al.* (112) a démontré que le plasma provenant de



femmes enceintes souffrant d'hypertension de grossesse, lorsqu'appliqué sur des préparations d'artères mésentériques de chien, amenait une plus grande réponse à la norépinéphrine. Ils suggèrent une implication possible d'une substance contractile qui contribuerait au développement de l'hypertension chez la femme enceinte.

Tsukimori *et al.* (158) ont mesuré la destruction de cellules endothéliales *in vitro* en utilisant du plasma de femmes souffrant de prééclampsie. Ils ont observé qu'il y avait une grande destruction des cellules endothéliales lors dans cette condition, suggérant la production d'agents cytotoxiques pour les cellules endothéliales, ou par d'autres tissus, lors de la prééclampsie.

Cette combinaison de facteurs avec beaucoup d'autres pourrait contribuer à la mise en place de cette complication de grossesse. Il reste encore beaucoup d'études à faire afin d'élucider les mécanismes pathologiques de plusieurs complications de la grossesse tels l'hypertension de grossesse, la prééclampsie et l'éclampsie (fait suite à la prééclampsie et se caractérise par l'apparition de convulsions). Afin d'élucider et de cerner ces mécanismes, il faut comprendre les mécanismes amenant les changements physiologiques lors de la grossesse normale. Plusieurs études ont été effectuées et sont présentement en cours afin d'élucider les mécanismes amenant les changements hémodynamiques lors de la grossesse normale.

## **1.2 Réactivité vasculaire lors de la gestation**

Lors de la gestation, la résistance vasculaire est diminuée. Ceci s'accompagne d'une diminution de la réactivité aux agents vasoconstricteurs. Cette diminution de réactivité est bénéfique pour la mère et le fœtus. Ces modifications ne

s'installeraient pas lors des complications de grossesse telles la prééclampsie, l'hypertension de grossesse, etc. Il est donc important de comprendre les mécanismes amenant la diminution de la réactivité vasculaire lors de la gestation afin de mieux cibler les mécanismes pouvant être défectueux dans ces conditions pathologiques.

### *1.2.1 Systémique*

Erkkola *et al.* (33) ont rapporté que les brebis gestantes avaient une réponse pressive réduite à différents vasoconstricteurs. Des agents qui pourraient contribuer à ce phénomène incluent une production accrue d'agents vasodilatateurs tels l'EDRF (NO) et les prostaglandines (vasorelaxantes) et une diminution de la sensibilité du muscle lisse vasculaire aux stimuli vasoconstricteurs tels les agonistes adrénergiques (28;75;144;159). La sensibilité réduite du muscle lisse vasculaire aux agonistes adrénergiques de la rate gestante se traduit par une augmentation de la concentration produisant 50% de la réponse maximale en comparaison à la rate vierge (144).

#### *1.2.1.1 Changements morphologiques*

Une étude de McLaughlin *et al.* (95) a démontré une diminution significative de l'épaisseur de la paroi du vaisseau de résistance mésentérique lors de la gestation. Danforth *et al.* (27) ont démontré histologiquement que, pendant la gestation, un changement dans le contenu en élastine et en collagène se produisait dans les artères, changement semblable à celui observé chez des animaux traités aux oestrogènes. La relation entre la tension passive et la circonférence interne du vaisseau était significativement diminuée lors de la gestation. McLaughlin *et al.* (95) suggèrent un changement dans les caractéristiques du collagène chez les rates gestantes.

La distensibilité des artères mésentériques était moins grande lors de la gestation (91). La diminution des propriétés mécaniques et du contenu de protéines extracellulaires matricielles supportent le concept que la paroi du vaisseau subit une restructuration ce qui pourrait expliquer, en partie, l'adaptation de la vasculature systémique observée lors de la gestation (91). Contrairement à ces observations, St-Louis et al. (142) n'ont pas observé de changements significatifs dans la résistance à l'étirement (distensibilité) des vaisseaux de résistance mésentériques de rates. Ces résultats ont été obtenus en soumettant les vaisseaux à une augmentation de la pression interne et en mesurant l'agrandissement de son diamètre en rapport à un diamètre donné. Par contre, Mackey *et al.* (91) ont observé une augmentation significative dans la distensibilité des vaisseaux sanguins mésentériques de rates gestantes à comparé aux non gestantes. Cette différence de résultats entre ces deux groupes pourrait s'expliquer par la présence d'endothélium fonctionnel. Cette structure était inhibée pour le groupe de St-Louis tandis qu'aucun moyen n'était utilisé pour l'inhiber pour le groupe de Mackey.

#### 1.2.1.2 Contraction

Lors de la gestation, Crandall *et al.* (26) ont aussi démontré une moins grande contractilité à la noradrénaline des artères mésentériques de résistance. Sur le même type de vaisseau, Davidge *et al.* (28) soutiennent que seul une diminution de sensibilité à la phényléphrine a été observée. La diminution de la réponse aux agents contractiles  $\alpha$ -adrénergiques dans la circulation systémique n'est pas régie par une

diminution de l'affinité de ces récepteurs mais pourrait être influencée par la diminution de la densité de ces récepteurs dans la circulation systémique (137).

Aucune différence dans la contraction maximale n'a d'ailleurs été observée en présence ou en absence de L-NAME, un inhibiteur de la production de monoxyde d'azote, avec un endothélium fonctionnel. Davidge *et al.* (28) ont démontré que la diminution de sensibilité à la phényléphrine de la vasculature mésentérique n'était pas régie par le facteur de relaxation de l'endothélium (EDRF) ou par des prostaglandines de la voie de la cyclooxygénase, et ce malgré l'augmentation de la possibilité de relaxation des agents dérivés de l'endothélium pendant la gestation. Parent *et al.* (121) ont aussi observé une diminution de sensibilité à la norépinéphrine et à la phényléphrine en présence ou en l'absence d'endothélium. Ceci indique que l'endothélium, du moins, le facteur de relaxation dérivé de l'endothélium, l'EDRF, ne serait pas impliqué dans une diminution de réactivité de la vasculature systémique aux agents vasoconstricteurs.

Lors de la gestation, des réponses vasoconstrictrices à l'angiotensine II de moins grande amplitude sont obtenues chez différents animaux. Parent *et al.* (122) n'ont pas observé de diminution de récepteurs d'angiotensine II dans la vasculature mésentérique de la rate gestante. Mackanjee *et al.* (90) ont fait la même observation dans trois lits vasculaires provenant de brebis gestantes, soit l'artère mésentérique, l'artère utérine et l'aorte. En effet, malgré une hausse de trois à quatre fois du niveau d'angiotensine II dans la circulation pendant la gestation, la densité et l'affinité des récepteurs pour l'angiotensine II ne sont pas affectés dans l'aorte, dans l'artère mésentérique ainsi que dans l'artère utérine. Par contre, chez la lapine gestante, la

densité de récepteurs diminue tandis que leur affinité ne change pas dans le lit vasculaire mésentérique (15).

Les nombreuses études ont donc démontré une diminution de la sensibilité et de la contractilité du muscle lisse vasculaire lors de la gestation. Ces changements ne seraient pas régies par une diminution du nombre de récepteurs aux agents vasoconstricteurs ou à une diminution de la concentration circulante de ces agents.

### 1.2.1.3 Relaxation

Le peptide natriurétique de l'oreillette (ANP) est intimement impliqué dans l'homéostasie des fluides et du sodium. Il exerce une activité relaxante sur le muscle lisse vasculaire pré-contracté à l'angiotensine II (152). Les résultats obtenus par Thomsen *et al.* (152) suggèrent que l'ANP ne fonctionne pas comme vasodilatateur lors de la gestation. Kim *et al.* (79) ont étudié l'effet de l'endothélium sur la contraction des artères mésentériques. La contraction des artères mésentériques était augmentée par la dénudation endothéliale des vaisseaux. De plus, dans cette étude, ils ont démontré que la gestation augmente la relaxation à l'acétylcholine des artères mésentériques mais pas des artères rénales.

Le tonus basal des petites artères est déterminé par la quantité de tonus générée par la paroi vasculaire, i.e. le tonus myogène intrinsèque. Il y a une relation étroite entre la concentration intracellulaire de calcium et ce tonus dans les petites artères (114). La concentration intracellulaire est étroitement contrôlée à l'état de repos et à l'état activé du muscle lisse vasculaire. L'activité des canaux calciques dépendant du

voltage de type L est d'ailleurs un déterminant important de la concentration intracellulaire de calcium lors de l'activation du muscle lisse vasculaire. La probabilité de l'état ouvert de ce canal est beaucoup influencée par le potentiel membranaire étant donné qu'il augmente de 2.7 fois pour chaque 7 à 9 mV de dépolarisation membranaire (13;114).

### **1.3 Le vaisseau sanguin**

#### *1.3.1 Structures des vaisseaux sanguins*

Les grosses et petites artères sont constituées de l'adventice, de la média et de l'intima. Ces trois structures jouent un rôle lors de la contraction du vaisseau et dans le maintien de son tonus.

##### 1.3.1.1 Adventice

Autant dans les gros vaisseaux que dans les petits, l'adventice contient de l'élastine, du collagène, des fibroblastes, des cellules souches, des macrophages et des cellules de Schwann associées à des axones (127). La proportion de la paroi vasculaire qu'occupe cette structure est variable.

##### 1.3.1.2 Média

La média des petites artères, comme dans les grosses artères, se trouve entre une lamina élastique du côté luminal et une lamina élastique fractionnée du côté externe (19;86). Le nombre de couches de cellules musculaires lisses dans la média des petites artères diminue avec le diamètre du vaisseau, à partir d'environ six couches pour

les vaisseaux de 300  $\mu\text{m}$  (86) à une simple couche dans les artérioles pré-capillaires de 30 à 50  $\mu\text{m}$ . La proportion de cellules musculaires lisses dans la média des petites artères (artères de moins de 300  $\mu\text{m}$ ), basée sur des micrographies électroniques, est d'environ 70 à 85% (85). Cette proportion est plus grande que celle observée dans les vaisseaux de plus grand calibre (153). Par contre, l'épaisseur de la paroi vasculaire occupée par la média diminue avec le diamètre du vaisseau mais la proportion de la paroi vasculaire occupée par les cellules musculaires lisses reste similaire indépendamment du diamètre du vaisseau. On retrouve au moins deux couches de cellules musculaires lisses par vaisseau. Une couche possède un arrangement longitudinal ayant un faible angle et l'autre possède un arrangement circulaire. Des données suggèrent que le volume des cellules musculaires lisses diminue avec le diamètre du vaisseau (138).

Les cellules musculaires lisses semblent être reliées mécaniquement entre elles surtout par des contacts membranaires avec peu de fibres de collagène entre les cellules, les jonctions serrées. Donc, même si les cellules musculaires lisses des petites artères semblent former un syncytium électrique (65), l'information à propos de possibles connections électriques ("gap junctions") entre les cellules est manquante.

### 1.3.1.3 Intima

L'intima est composée de cellules endothéliales ayant une structure squameuse et formant une monocouche continue. Les cellules sont orientées parallèlement au flot sanguin. Il est important de noter que les cellules endothéliales des petites artères projettent fréquemment à travers des fenestrations de la lamina élastique dans la média interne et pourraient faire contact avec la cellule musculaire lisse dans la

média (19). L'espace sous-endothélial contient des fibres élastiques et des fibres de collagène.

#### **1.4 Contraction et relaxation musculaire lisse**

##### **1.4.1 Mécanismes de la contraction**

La production d'un tonus par la cellule musculaire lisse vasculaire est dépendante de l'interaction de deux protéines contractiles majeures, l'actine et la myosine. Un mécanisme de glissement des filaments, semblable à ce que l'on retrouve dans le muscle strié, est proposé par plusieurs investigateurs (70). Dans ce modèle, les têtes de myosine subissent un cycle de haute et de basse affinité de liaison à l'actine. Cette liaison est sous le contrôle de l'hydrolyse d'ATP.

Dans le muscle lisse, les filaments minces incluent l'actine, la tropomyosine et d'autres protéines. Ces protéines sont attachées à la membrane par des plaques d'ancrage, les corps denses (59). Il a été suggéré que ces corps denses sont maintenus en un réseau tridimensionnel conférant la forme à la cellule (11).

La caractéristique principale de la contraction musculaire en réponse à un stimulus pharmacologique ou électrique est une augmentation initiale rapide de phosphorylation de la chaîne légère de myosine de 20 kDa (54). La tension, d'autre part, augmente plus lentement et se maintient même lorsque le niveau de chaîne légère de myosine phosphorylée et que la concentration intracellulaire de calcium libre diminuent. Ce mécanisme est énergétiquement rentable car la tension est maintenue malgré une diminution de consommation d'ATP.

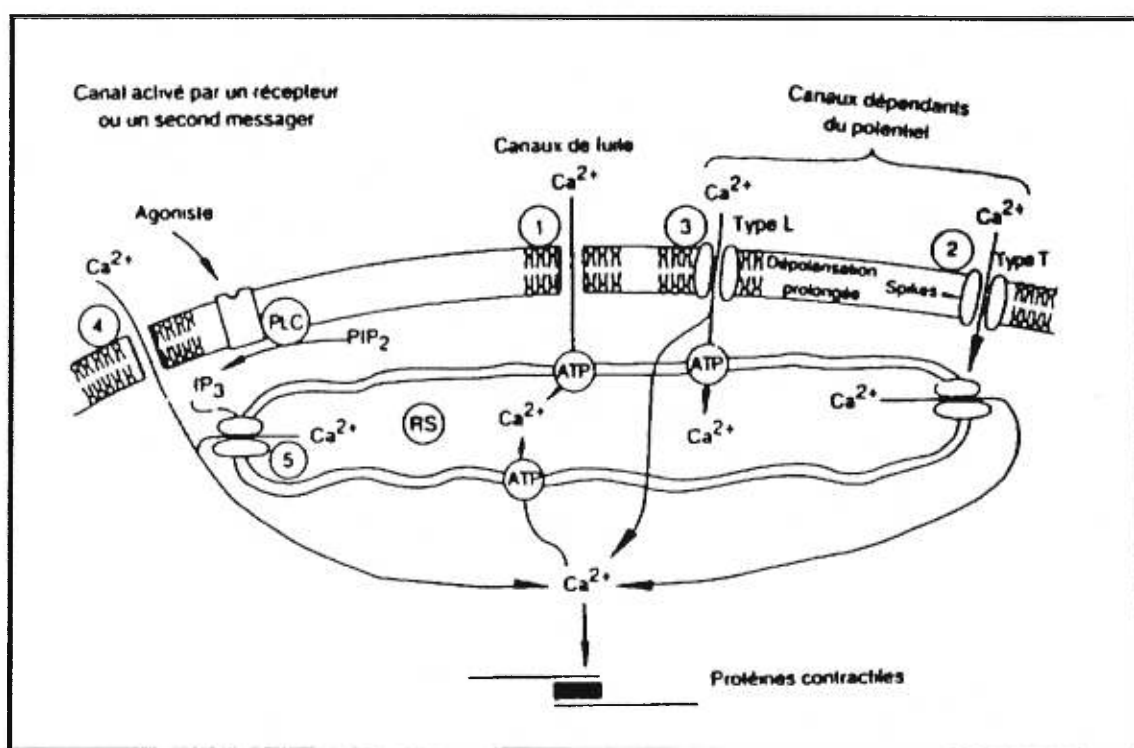


Afin de contracter, le muscle vasculaire lisse requiert une augmentation de calcium cytosolique (voir Figure 1). Cette mobilisation peut s'effectuer par plusieurs voies. Différentes hormones agissant par des récepteurs couplés à des protéines G activent la phospholipase C liée à la membrane qui convertit la L- $\alpha$ -phosphatidil inositol biphosphate (PIP<sub>2</sub>) en diacylglycérol (DAG) et inositol-1,4,5 triphosphate (InsP<sub>3</sub>). Celui-ci stimule la relâche de calcium du réticulum endoplasmique via un récepteur aux InsP<sub>3</sub>, décrit comme un canal calcique. Suite à sa stimulation par l'InsP<sub>3</sub>, le calcium entre dans le cytoplasme et se lie à la calmoduline qu'il active. La liaison de ce complexe à la kinase de la chaîne légère de myosine forme une holoenzyme activée. La phosphorylation de la chaîne légère de myosine se traduit en une activation de la myosine ATPase par l'actine, le développement de force et le raccourcissement du muscle. Dans un deuxième temps, la synthèse de diacylglycérol dans la membrane et l'augmentation du calcium intracellulaire amènent un changement de conformation et une translocation de la protéine kinase C du cytoplasme vers le sarcolemme. La protéine kinase C phosphoryle plusieurs protéines du sarcolemme et, par ce mécanisme, stimule l'activité de l'échangeur Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>. Ceci augmente le temps d'ouverture des canaux calciques dépendant du voltage de type L (59).

**Figure 1:** Les principaux systèmes mobilisant le calcium de la cellule musculaire lisse.

1. Entrée passive de calcium extracellulaire par des canaux de fuite (“leak channels”);
2. Canaux dépendant du potentiel (type T) (l’entrée de calcium peut activer une libération secondaire de calcium mais ne charge pas le réticulum sarcoplasmique);
3. Canaux dépendant du potentiel (type L) (l’entrée de calcium peut charger le réticulum sarcoplasmique et activer directement les protéines contractiles);
4. Canal activé par un récepteur ou un second messenger (l’entrée de calcium ne charge pas le réticulum sarcoplasmique mais active directement les protéines contractiles);
5. Libération du calcium du réticulum sarcoplasmique par liaison de l’InsP3 à un récepteur de la membrane du réticulum sarcoplasmique. (Tiré de: Pharmacologie Moléculaire, Landry Y., Gies JP. Arnette, Paris, 1993. p. 593)

FIGURE 1



La phosphorylation de la chaîne légère de myosine est donc un indicateur potentiel des événements biochimiques contrôlant la contraction. La contraction et la relaxation des muscles de l'utérus, le myomètre, sont contrôlées par la phosphorylation et la déphosphorylation de la chaîne légère de la myosine de 20 kDa.

Deux autres mécanismes de contrôle du calcium dans le cytoplasme seraient l'échangeur  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  et la relâche de calcium sarcoplasmique par des canaux spécialisés sensibles à la ryanodine (59).

#### 1.4.2 Mécanismes de la relaxation

Plusieurs mécanismes de relaxation du muscle lisse vasculaire ont été proposés. La déphosphorylation de la myosine peut être catalysée par la myosine phosphatase. Parce que la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (20 kDa) est un événement régulateur important, des altérations dans la concentration de calcium libre cytosolique, dans la concentration de calmoduline et dans l'activité de la kinase ou de la phosphatase auraient pour conséquence une modification de la phosphorylation de la chaîne légère. S'il y a diminution de phosphorylation de la chaîne légère de myosine, il y a relaxation du muscle lisse vasculaire ou absence de contraction.

*In vitro*, la chaîne légère de la myosine peut être phosphorylée par plusieurs protéines kinases. Dépendamment du résidu phosphorylé, cette chaîne augmentera ou diminuera son affinité pour la calmoduline. La protéine kinase dépendante de l'AMPc et la protéine kinase II dépendante de la calmoduline diminuent l'affinité de la kinase de la chaîne légère de la myosine pour la calmoduline. Plusieurs

phosphoprotéines phosphatases ont été isolées et pourraient contribuer à la déphosphorylation de la chaîne légère de la myosine.

Plusieurs stimuli activent la production de prostacycline ( $PGI_2$ ) dans les cellules endothéliales et musculaires lisses. L'action vasodilatatrice de ce composé a été démontré dans plusieurs modèles d'animaux. Les propriétés vasodilatatrices de la  $PGI_2$  semblent être régies par l'induction de l'activité adénylate cyclase musculaire aboutissant à la génération d'AMPc lequel stimule les systèmes protéiques intracellulaires de séquestration du calcium dans les compartiments membranaires non-métaboliques. La diminution de calcium intracellulaire ne permet plus les phosphorylations nécessaires à l'interaction actine-myosine, inhibant ainsi la contraction cellulaire (52).

Il existe une autre substance produite par l'endothélium qui empêche la contraction musculaire lisse, l'EDRF (endothelium-derived relaxing factor). L'EDRF se lie avec la guanylate cyclase soluble afin de former le GMPc. Une protéine kinase sensible à la GMPc est alors activée. Elle exerce un effet inhibiteur sur la phospholipase C, active les ATPases calciques du sarcolemme et du réticulum endoplasmique favorisant la sortie du calcium vers l'extérieur de la cellule et vers l'entreposage dans des réservoirs intracellulaires (calciosomes). L'activation de la protéine kinase GMP-dépendante mènera à la déphosphorylation des chaînes légères de la myosine.

Un autre mécanisme de relaxation du muscle lisse vasculaire est sans contredit l'hyperpolarisation de la cellule. Ceci peut s'effectuer par l'entremise des canaux potassiques. Plusieurs types de canaux potassiques ont été détectés dans le myocyte vasculaire incluant le canal potassique activé par le calcium, le canal potassique

à rectification retardée et le canal potassique sensible à l'ATP (25;83;114). Une augmentation de la conductance du potassium résultant de l'activation de ces canaux amène une hyperpolarisation de la membrane avec inactivation subséquente des canaux calciques dépendant du voltage et une augmentation de l'extrusion du calcium via la pompe  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$  (84). Dans les deux cas, la réponse physiologique est la relaxation ou une résistance à la contraction. Une autre substance est aussi soupçonnée. Il s'agit de l'EDHF (*endothelium derived hyperpolarizing factor*). Cette substance sera amenée dans la discussion.

## ***1.5 Mobilisation du calcium extracellulaire par la cellule musculaire lisse vasculaire***

### *1.5.1 Canaux calciques dépendants du voltage.*

#### *1.5.1.1 Généralités*

De nombreuses fonctions cellulaires sont contrôlées par l'influx de calcium à travers la membrane plasmique. Ces fonctions peuvent être aussi diverses que la relâche de neurotransmetteurs, la sécrétion d'hormones, la migration et la croissance cellulaire et la contraction des muscles. Le canal calcique dépendant du voltage est une voie d'entrée de calcium la mieux caractérisée surtout à cause de la disponibilité de plusieurs agents modulateurs spécifiques.

Plusieurs types de canaux calciques dépendant du voltage ont été identifiés. On retrouve les canaux calciques de type N, P, T, B, R et L. Quelques uns de ces canaux n'ont pas encore été pleinement caractérisés. De plus, plusieurs de ces

canaux ont été clonés et transfectés dans des cellules et ont été caractérisés en profondeur à l'aide d'études électrophysiologiques, biochimiques et moléculaires.

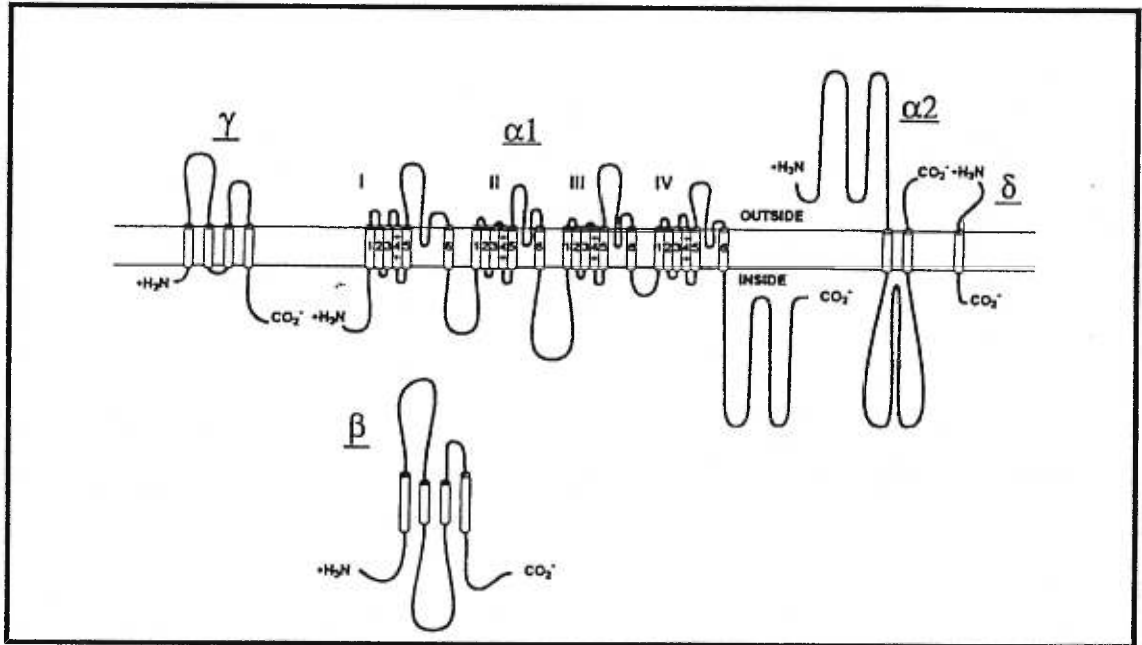
Les données de base de la composition et des domaines fonctionnels des canaux calciques sont dérivés principalement de travaux de purification de canaux provenant du muscle squelettique. C'est donc avec discernement qu'il faille appliquer les résultats obtenus à d'autres types de canaux et à d'autres tissus (muscle lisse et muscle cardiaque). Ainsi, les canaux calciques dépendant du voltage sont, pour la plupart, composés de cinq sous-unités:  $\alpha_1$ ,  $\beta$ ,  $\alpha_2/\delta$  et  $\gamma$  (voir Figure 2). La sous-unité  $\alpha_1$  cumule une bonne proportion des fonctions du canal. Cependant, des études biochimiques et immunologiques indiquent que ces cinq sous-unités sont associées sur une base 1:1, c'est-à-dire qu'il y a une seule sous-unité par molécule de canal calcique (33;136;146). Indépendamment du mécanisme de perméabilité aux ions que possède les canaux calciques, les ions ont la capacité de traverser le filtre de sélectivité et le canal seulement lorsque le canal est dans la conformation activée.

Les canaux calciques retrouvés sur la plupart des cellules possèdent trois conformations: l'état fermé où le canal est fermé mais disponible à l'ouverture (forme prédominante dans la cellule polarisée); le mode ouvert ou activé, promu par des vagues de dépolarisation dépassant un certain niveau de potentiel; l'état inactivé dans lequel le canal calcique est fermé et non disponible à l'ouverture, favorisé par une dépolarisation prolongée (155). En se basant sur le type de stimulus requis pour convertir un canal à son état activé, les canaux calciques ont été séparés en deux grands groupes: les canaux calciques dépendant du voltage et les canaux calciques opérés par un récepteur (ROC).

**Figure 2:** Structure du canaux calciques dépendant du voltage de type L de muscle squelettique. Les cylindres représentent des hélices  $\alpha$  dans la membrane. L'arrangement transmembranaire des structures  $\gamma$  et  $\alpha_2/\delta$  se veut tentative selon des études d'hydropaticité préliminaires. (Tiré de Catterall WA. Structure and modulation of  $\text{Na}^+$  and Calcium $^{2+}$  channels. Annals of the New York Academy of Sciences. p. 1-19.)



FIGURE 2



En employant une technique de voltage-clamp, i.e. où on peut changer rapidement le potentiel membranaire ou le maintenir à un voltage désiré, il est possible d'analyser les types de courant en fonction du potentiel. La dépolarisation de la cellule augmente la conductance des canaux calciques dépendant du voltage (61;62). À un potentiel membranaire donné, tous les canaux calciques membranaires fluctuent entre l'état activé et l'état inactivé. Dans une population de canaux calciques donnée, donc, la fraction des canaux calciques à l'état activé dépendra de la probabilité qu'a un canal à se trouver dans cet état.

Les cellules musculaires lisses des artères et des artérioles, *in vitro*, ont un potentiel membranaire stable se situant entre -60 mV et -75 mV (66), alors qu'*in vivo* (113), il se situe autour de -40 mV à -55 mV (66). Lorsque les artères mésentériques, *in vitro*, sont soumises à des pressions transmuraux physiologiques, elles se dépolarisent à -40 mV ou -55 mV et ainsi maintiennent un tonus myogénique intrinsèque (66).

Les canaux calciques, comme les autres canaux ioniques, prennent des conformations conductrices et non conductrices d'ions (ouvert et fermé, respectivement) (voir Figure 3). Le temps que passe le canal calcique dans l'une ou l'autre des conformations est contrôlée par le potentiel membranaire. La fraction de temps qu'un canal calcique est ouvert, la probabilité d'ouverture, augmente exponentiellement selon la dépolarisation de la membrane et ce, à partir de potentiels hyperpolarisés de -70 mV. Cette augmentation de la probabilité d'ouverture selon le potentiel membranaire est limitée par l'état inactivé. De plus, la fraction de canaux calciques fonctionnels, capables de répondre à un potentiel membranaire, pourrait être sujet à des procédés régulateurs tel que la phosphorylation.

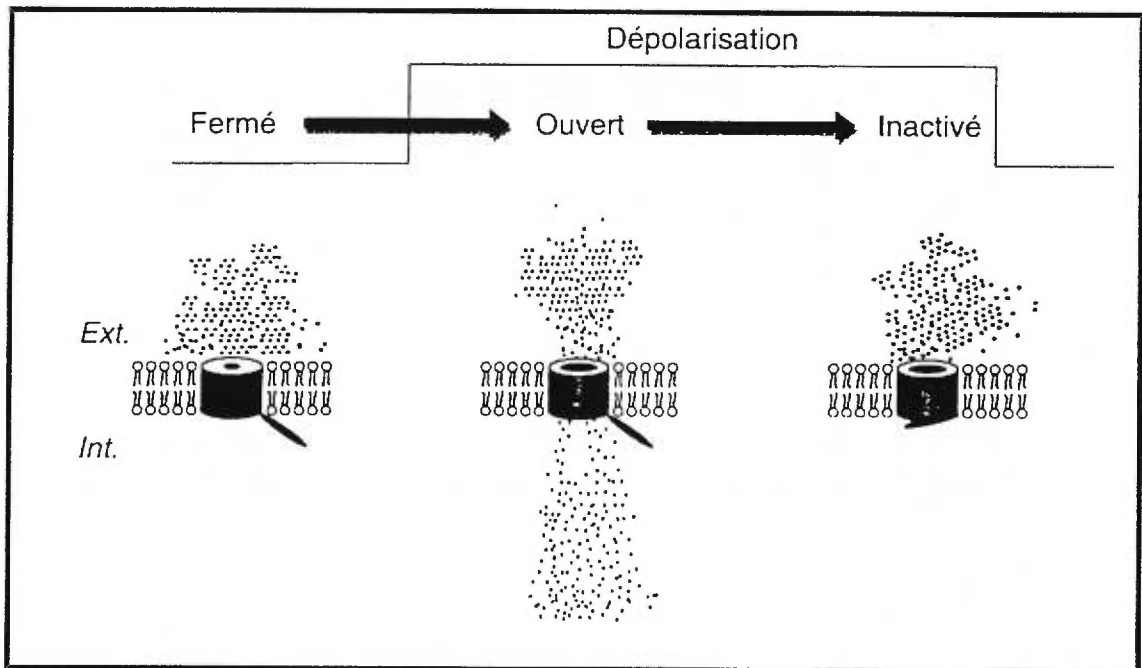
Étant donné la dépendance de la fonction des canaux au voltage membranaire, une hyperpolarisation de 2 mV pourrait diminuer la probabilité d'ouverture du canal par 30% (114). Un agent augmentant l'inactivation du canal ferait en sorte que la probabilité d'ouverture du canal soit moins sensible à un changement du potentiel membranaire. Il est possible qu'à des intervalles de potentiels membranaires physiologiques de -55 mV à -40 mV, les canaux calciques opèrent en-deçà de la moitié de leur action, c'est-à-dire que moins de la moitié de la quantité de canaux calciques à la surface de la cellules serait sollicitée (114).

Un canal calcique inactivé est clos et ne laisse pas passer de calcium (voir Figure 3). Le stimulus spécifique qui initie la conversion du canal calcique de l'état fermé ou activé vers l'état inactivé diffère selon les types de canaux calciques. Dans certains cas, la longue durée de la dépolarisation amènera l'inactivation. En général, l'inactivation des canaux calciques démontre une cinétique plus lente et se produit dans un intervalle de potentiel membranaire plus positif que l'inactivation des canaux sodiques (31).

L'hypothèse que les canaux calciques dépendant du voltage soient impliqués dans le maintien du tonus vasculaire des artères de résistance est supporté par beaucoup d'observations. Entre autres, les bloqueurs des canaux calciques dépendant du voltage diminuent la pression artérielle *in vivo* en causant une vasodilatation chez les sujets normotendus et hypertendus (74). Le tonus des artères de résistance cérébrales et systémiques, *in vitro*, est dépendant du calcium extracellulaire et peut être aboli par les bloqueurs de canaux calciques (74). Par exemple, les artères de résistance cérébrales,

**Figure 3:** Fonction des canaux calciques dépendant du voltage. Une dépolarisation à partir du potentiel de repos de la cellule vers un potentiel proche du plateau d'un potentiel d'action induit l'ouverture transitoire des canaux calciques et une entrée de calcium qui diminue en fonction du temps. Par la suite, une structure située sur la face interne de la protéine vient bloquer progressivement l'entrée d'ions calcium (inactivation). (Tiré de Nargeot J., Charnet P. Diversité moléculaire des canaux calciques: du gène à la fonction. *Médecine/Sciences* 1994. 10:1293-1308.)

FIGURE 3



systemiques et rénales soumises à des pressions transmurales physiologiques démontrent un tonus myogénique spontané qui est dépendant du calcium extracellulaire (55,57) et qui est complètement aboli par les antagonistes du calcium (56) et par l'hyperpolarisation de la membrane (14).

### *1.5.2 Canaux calciques opérés par un récepteur*

Ces canaux calciques liés à l'activation de récepteurs membranaires ont été appelés canaux calciques opérés par un récepteur (ROC). Bien qu'ils jouent un rôle important dans le comportement du muscle lisse et de plusieurs cellules sécrétrices, les ROCs ont beaucoup moins attiré l'attention que les canaux calciques dépendant du voltage. Leurs propriétés spécifiques demeurent largement inconnues. Cependant, bien que les canaux calciques opérés par un récepteur n'aient pas encore été formellement identifiés par des techniques moléculaires ou d'électrophysiologiques, largement à cause d'un manque d'agonistes et d'antagonistes spécifiques, leur existence est suggérée par de nombreuses études fonctionnelles (69).

Il a été proposé, dans le muscle lisse vasculaire artériel, que les vasoconstricteurs augmentent l'entrée de calcium en ouvrant des canaux calciques indépendant du voltage (ROC). La noradrénaline induit une réponse contractile dans les branches d'artère mésentérique du rat. À de basses concentrations, cette contraction était associée à une dépolarisation de la cellule musculaire lisse vasculaire de -59 mV à -34 mV (109). De plus de fortes concentrations de noradrénaline n'ont pas augmenté cette dépolarisation. Une augmentation de la concentration de potassium de 20 à 125 mM dans la solution physiologique produit une augmentation linéaire de la

dépolarisation équivalant 50 mV/100 mM de potassium (109). Cette équipe a découvert que la concentration nécessaire de potassium pour induire une contraction se situe entre 30 et 83 mM (109). Dans l'écart de potentiel généré par la noradrénaline mentionné ci-haut, le potassium n'a produit que 38% de la réponse maximale à la norépinéphrine. Par contre, sur des vaisseaux complètement dépolarisés au potassium, la noradrénaline a stimulé l'entrée de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  au même niveau que dans une solution physiologique normale, c'est-à-dire que sur des tissus non dépolarisés. Le changement du potentiel membranaire induit par la noradrénaline dans ces petites artères pourrait être dû à l'entrée de calcium par des canaux calciques opérés par un récepteur plutôt qu'à une dépolarisation de la membrane et à l'activation des canaux calciques dépendant du voltage. Ceci est supportée par l'observation que, dans les artères mésentériques du lapin, le diltiazem, un bloqueur des canaux calciques dépendant du voltage, a aboli l'influx de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  au potassium ainsi que le changement de potentiel membranaire sans diminuer l'influx de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  à la noradrénaline (22).

## *1.6 Types de canaux calciques dépendants du voltage*

### *1.6.1 Canaux calciques de type B.*

Les canaux calciques dépendant du voltage de type B sont aussi connus sous le nom de "brain-type". Ils pourraient inclure les canaux de type T car leurs caractéristiques sont très semblables. Ils sont activés à de hauts potentiels membranaires (autour de -30 mV) et s'inactivent lentement. On les retrouve dans des cellules neuronales et non-neuronales (8;156). Ce canal a été identifié par clonage et est présent en grande quantité dans le cerveau (116;139). Ces clones d'ADNc transfectés dans des

cellules pourraient être responsables d'un courant calcique qui n'est pas bloqué par une combinaison de bloqueurs pour les canaux de type L, N et P (102).

### 1.6.2 Canaux calciques de type N.

Le canal calcique de type N porte son nom à cause de l'analogie suivante: ni L, ni T ("neither L nor T channel"). Il est activé à de hauts potentiels membranaires (autour de -30 mV), ils s'inactivent lentement. Comme le précédent, il est exprimé dans les cellules neuronales et non-neuronales (8;156). Ces canaux sont bloqués spécifiquement par la toxine  $\omega$ -conotoxine GVIA (64;101;103). La sécrétion de neurotransmetteurs est liée à ce type de canal.

Tsien *et al.* (82) ont observé que le récepteur présynaptique  $\alpha_2$ -adrénergique, lorsque stimulé à la noradrénaline, inhibe le passage du calcium par les canaux calciques de type N. Donc, quelques canaux de type N, bien qu'activés par le voltage et contribuant à la relâche de neurotransmetteurs, pourraient être modulés par des systèmes de seconds messagers comme les protéines G. Ceci pourrait être accompli par un rétrocontrôle de l'agent relâché sur les neurones. Il pourrait y avoir une certaine variété de canaux calciques de type N car leurs propriétés électrophysiologiques varient selon le tissu. Ces canaux sont aussi couplés à des systèmes de seconds messagers.

### 1.6.3 Canaux calciques de type T.

Les canaux calciques de type T sont aussi connus sous le nom de "tiny" ou de "transient". Ils sont activés et inactivés à de bas potentiels membranaires (-70 mV) et sont présents dans une grande variété de cellules excitables et non-excitables.



Le canal calcique de type T peut être activé par de petites dépolarisations, subit une inactivation rapide voltage-dépendant, est insensible aux dihydropyridines et aux autres antagonistes organiques du calcium et possède une petite conductance unitaire de 8 pS (picoSiemens) (37;38). Les canaux calciques de type T sont perméables au sodium en l'absence de cations divalents et sont bloqués par de fortes concentrations de calcium tout comme les canaux calciques de type L.

Les canaux calciques de type T ont des propriétés électrophysiologiques très différentes de celles des canaux calciques de type L, décrits plus loin. Ils pourraient être important pour l'activité "pace-maker" de plusieurs tissus. Ce canal est retrouvé dans plusieurs tissus et possède peu ou pas d'antagonistes spécifiques. Ce manque de sondes spécifiques empêche sa détermination structurelle.

#### *1.6.4 Canaux calciques de type P.*

Les canaux calciques de type P portent leur nom du fait qu'ils ont été découverts dans des cellules de Purkinje (88). Ils sont activés à de hauts potentiels membranaires (autour de -30 mV), ils s'inactivent lentement et sont exprimés dans des cellules neuronales et non-neuronales (8;156). Ils sont bloqués spécifiquement par la toxine  $\omega$ -Aga-IVA ("funnel web spider venom") (103). Ils sont résistants aux dihydropyridines et à la  $\omega$ -conotoxine. Ils pourraient être responsables de la relâche de neurotransmetteurs dans plusieurs régions du cerveau (63). Ces canaux démontrent peu d'inactivation.

### 1.6.5 Canaux calciques de type L.

Les canaux calciques de type L sont appelés ainsi pour "long-lasting". Ils sont activés à de hauts potentiels membranaires (autour de -30 mV), ils s'inactivent lentement et sont exprimés dans des cellules neuronales et non-neuronales (8;156). Ils sont facilement bloqués par les dihydropyridines, les phénylalkylamines et par les benzothiazépines (21;46;67). Dans le muscle lisse, ils sont impliqués dans le développement de la tension de la paroi (contraction-relaxation) en procurant une partie du calcium extracellulaire nécessaire, provenant de l'extérieur de la cellule.

Le canal calcique de type L possède un seuil d'activation de bas voltage, une inactivation calcium-dépendant de bas voltage, une grande conductance (25 pS), une haute sensibilité aux dihydropyridines et aux autres bloqueurs organiques des canaux calciques. Ils sont modulés ou activés par une grande variété de neurotransmetteurs, d'enzymes et d'agents pharmacologiques (123). Les canaux calciques de type L sont largement perméables aux cations monovalents en l'absence de cations divalents mais cette perméabilité est bloquée par des concentrations de l'ordre du micromolaire de calcium (157).

Il y a une grande densité de canaux calciques de type L dans les muscles squelettiques. La disponibilité de sondes radioactives de haute affinité a permis d'élucider la structure primaire de ce canal. Le canal calcique de type L pourrait être constitué de plusieurs sous-unités:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2/\delta$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (140) (Fig. 4).

Les antagonistes du calcium sont des agents pharmacologiques qui inhibent les contractions évoquées par l'entrée de calcium extracellulaire dans la cellule

musculaire lisse vasculaire stimulée par dépolarisation. Ils se lient de façon compétitive à leurs récepteurs. Cet effet a été décrit pour la première fois dans le laboratoire de Théophile Godfraind dans les années 1960 avec des agents prototypes d'antagonistes du calcium. L'ouverture des canaux calciques est une étape cruciale du couplage excitation-contraction dans le muscle lisse vasculaire ainsi que pour le muscle cardiaque. Les agents pharmacologiques bloquant ces canaux n'agissent pas en bloquant physiquement les canaux mais plutôt en diminuant leur probabilité d'ouverture. Les activateurs de ces canaux, tel le Bay K 8644, augmentent cette probabilité (98). Les canaux calciques dépendant du voltage de type L représentent la voie majeure d'entrée de calcium par dépolarisation dans le muscle lisse vasculaire (98). Des sites de liaison stéréosélectifs de haute affinité des classes principales d'antagonistes du calcium ont été identifiées dans le muscle lisse. L'utilisation d'énantiomères optiques pures (lévéogyre ou dextrogyre, + ou -) a permis de vérifier la spécificité de la liaison.

Des études de liaison sur des tissus vasculaires complets ont été effectuées. Une liaison spécifique plus grande a été observée sur les tissus qui avaient été dépolarisés au KCl. De plus, cette liaison était semblable à celle observée sur des préparations membranaires de ces mêmes tissus. Ceci indique que la dépolarisation induit un changement de conformation des canaux calciques qui amène une plus grande affinité pour les dihydropyridines. Celles-ci dépendraient du voltage afin d'interagir avec cette forme du canal dans ces tissus dépolarisés plutôt qu'avec les canaux calciques des tissus au repos (interaction avec la forme inactivée plutôt qu'avec la forme fermée du canal). Cette interaction des antagonistes du calcium avec les canaux calciques de type L correspond bien au modèle du récepteur modulé. Ce modèle prédit que le ligand

ionisé ne peut avoir accès au site de liaison que par une voie hydrophile, celle-ci n'étant disponible que lorsque le canal est ouvert (134).

Les canaux calciques de type L sensibles aux dihydropyridines se retrouvent dans tous les neurones, les cellules glandulaires et les cellules musculaires. Leur cinétique de voltage et de temps d'ouverture facilite la conversion de la dépolarisation de la membrane en un signal calcique intracellulaire qui peut initier une réponse cellulaire comme par exemple, le couplage excitation-contraction musculaire (123).

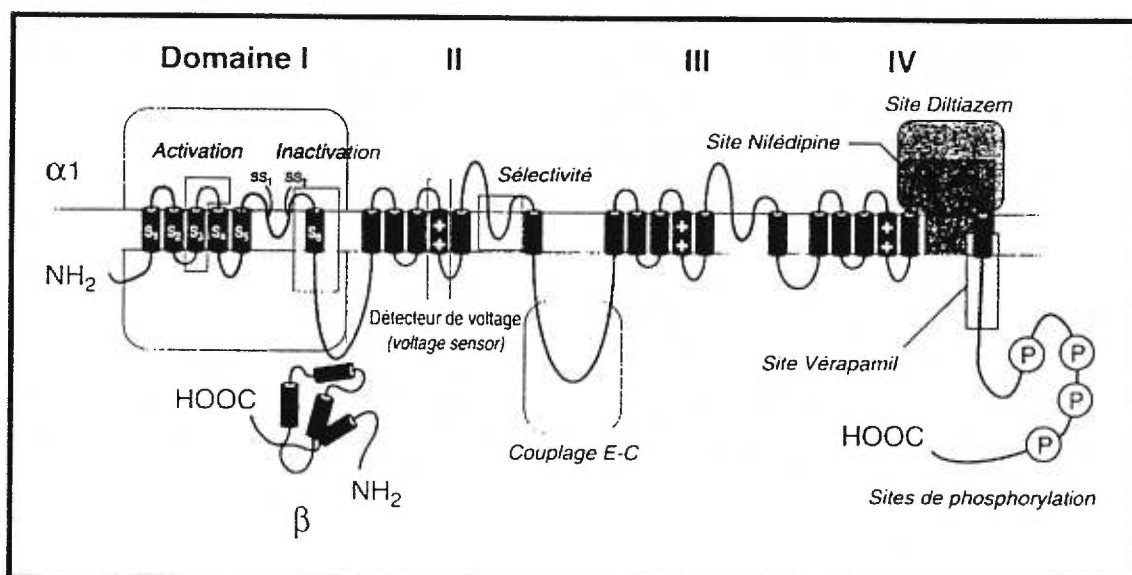
## ***1.7 Structure des canaux calciques dépendants du voltage.***

### *1.7.1 La sous-unité $\alpha_1$ .*

Des clones complets d'ADNc des sous-unités  $\alpha_1$ , qui dirigent l'expression directe de canaux calciques fonctionnels dans des ovocytes de Xénopes ou dans des cultures cellulaires, ont été fabriqués à partir d'ADN complet isolée de muscle squelettique, cardiaque et lisse, de glandes endocrines et de cerveau (voir le schéma représentatif à la Figure 4). Ces séquences primaires sont homologues les unes aux autres et montrent une homologie en acides aminés de 41% à 70%. Des études d'hydrospaticité, méthode permettant d'évaluer la disposition d'une molécule dans la membrane selon ses caractéristiques hydrophiles ou lipophiles, donnent une molécule à quatre répétitions homologues, chacune comprenant cinq hélices  $\alpha$  hydrophobes transmembranaires et un segment amphipatique (S4). La répétition I

**Figure 4:** Cartographie fonctionnelle de la sous-unité  $\alpha_1$  d'un canal calcique dépendant du voltage de type L. Le détecteur de voltage ("voltage sensor") se trouve au quatrième segment de chaque domaine. Les séquences de liaison pour les dihydropyridines, les benzothiazépines et les phénylalkylamines ont été caractérisés. Cette cartographie a été effectuées à partir de muscle squelettique mais pourrait s'appliquer aussi au muscle lisse. (Tiré de Nargeot J., Charnet P. Diversité moléculaire des canaux calciques: du gène à la fonction. *Médecine/Sciences* 1994. 10:1293-1308.)

FIGURE 4



détermine le temps d'activation du canal, c'est-à-dire une activation lente à une dépolarisation membranaire dans le muscle squelettique et une activation rapide dans le coeur (147). La boucle cytoplasmique entre les répétitions II et III détermine le type de couplage excitation-contraction; celle du muscle squelettique induit la contraction en l'absence de l'influx de calcium tandis que celle du muscle cardiaque en induit une seulement en présence de calcium (148). On peut s'attendre à ce que la boucle qui se trouve entre les répétitions II et III dans le muscle lisse vasculaire agisse plus comme celle du muscle cardiaque étant donné qu'un influx de calcium est nécessaire pour induire une contraction dans ce muscle. La répétition I, quant à elle, ressemblerait plutôt à celle retrouvée sur le muscle squelettique étant donné la lente contraction obtenue à l'activation de ce canal sur le muscle lisse vasculaire. Le détecteur de voltage (partie responsable de l'activation) se trouve à être le quatrième segment de chaque répétition. Le site d'interaction avec la sous-unité  $\beta$  est situé sur la boucle entre les répétitions I et II. La boucle extracellulaire entre les hélices transmembranaires 5 et 6 (région SS1-SS2) serait supposée se replier dans la membrane afin de former une partie du pore du canal (53) et prendre part au contrôle de la sélectivité des ions (60).

L'ARNm du gène CaCh1 a été cloné du muscle squelettique de lapin (149). Ce gène a été le premier découvert pour la sous-unité  $\alpha_1$  du canal calcique de type L. Le produit du gène CaCh1 se retrouve sous deux isoformes: une forme mineure (~ 5%) de 212 kDa contenant la séquence complète d'acides aminés codés par l'ARNm et une forme majeure (~ 95%) de 190 kDa dérivée du produit complet par protéolyse post-transcriptionnelle près de l'acide aminé 1690 (29). Les deux formes sont phosphorylées rapidement, *in vitro*, par une protéine kinase dépendante de l'AMPc au

résidu Ser-687 (128) localisé dans la boucle cytosolique entre la répétition II et III et lentement au résidu Ser-1617 (128). La sous-unité  $\alpha_1$  du muscle cardiaque (CaCh2a) (100) et lisse (CaCh2b) (9) sont des variantes d'un gène, le CaCh2. Ce gène est exprimé dans la plupart des tissus excitables et non-excitables incluant les fibroblastes. Les deux variantes sont à 95% homologues, la sous-unité  $\alpha_1$  du muscle cardiaque se différencie de celle du muscle lisse par un exon alternatif pour la région IVS3 (124). Les canaux calciques cardiaques et vasculaires, *in vivo*, diffèrent dans leur sensibilité aux dihydropyridines. Ceci pourrait suggérer, entre autre, que la pharmacologie distincte des canaux calciques cardiaques et vasculaires pourrait être basée, en partie, sur l'épissage alternatif de l'ARNm de CaCh2.

L'ADNc d'un troisième gène, CaCh3, a été isolé de tissus neuronaux et endocriniens et représente un canal calcique de type L, spécifique aux systèmes neuronal et endocrinien (135;162). Les canaux calciques issus du gène CaCh4 sont des canaux calciques ayant toutes les caractéristiques des canaux de type P (106).

Le gène CaCh5 a été cloné exclusivement à partir du cerveau. La sous-unité codée par ce gène lie la  $\omega$ -conotoxine GVIA avec une grande affinité l'identifiant donc comme étant un canal neuronal de type N (30). La sous-unité  $\alpha_1$  d'un canal calcique de type B a été cloné du gène CaCh6 (116;139). Le canal exprimé a les propriétés d'un canal calcique activé à bas voltage de type T. Par contre, contrairement aux canaux calciques de type T, ce canal s'inactive relativement lentement. Donc, son identité en rapport avec les canaux calciques de type T reste à être établie.

### 1.7.2 La sous-unité $\alpha_2/\delta$ .



La sous-unité  $\alpha_2/\delta$  du muscle squelettique provient du gène CaA1. C'est une protéine membranaire glycosylée de 125 kDa (32) qui est apparemment hautement conservée dans la plupart des tissus. La sous-unité transmembranaire  $\delta$  encre la protéine  $\alpha_2$  extracellulaire par des ponts disulfures à la membrane plasmique (77). Des immunobuvardages (118) et de buvardages de Northern (32) montrent que des sous-unités  $\alpha_2/\delta$  similaires existent dans le muscle squelettique, le cerveau, le muscle lisse vasculaire et intestinal. Ce qui suggère que la sous-unité  $\alpha_2/\delta$  est exprimée en combinaison avec la variété des sous-unités  $\alpha_1$ . Aucune fonction n'a encore été trouvée pour cette sous-unité.

### 1.7.3 La sous-unité $\beta$ .

La sous-unité  $\beta$  squelettique, CaB1, est une protéine membranaire intracellulaire et consiste en 524 acides aminés (131). Deux autres gènes codant pour des sous-unité  $\beta$  ont été isolés de bibliothèques cardiaques (68), le CaB2 et le CaB3. Le produit du gène CaB3 pourrait être exprimé de façon prédominante dans les cellules neuronales et les cellules musculaires lisses. Un autre gène, le CaB4, a été séquencé et est exprimé surtout dans le cervelet et le rein (20). Presque tous ces gènes peuvent subir de l'épissage alternatif ce qui donne plusieurs formes intermédiaires de cette sous-unité. Cette sous-unité augmenterait l'activité de la sous-unité  $\alpha_1$  lorsqu'exprimé ensemble dans un ovocyte de Xénope (131).

#### 1.7.4 *La sous-unité $\gamma$ .*

La sous-unité  $\gamma$  provient du gène CaG1 et consiste en 222 acides aminés. C'est une protéine ancrée dans la membrane (12;76). La séquence d'acides aminés déduite de la sous-unité contient quatre domaines transmembranaires et deux sites de glycosylation localisés du côté extracellulaire. Des études de PCR (réaction de polymérisation en chaîne) n'ont pas démontré sa présence dans d'autres tissus ce qui suggère qu'elle pourrait être spécifique au muscle squelettique. Aucune fonction n'a encore été trouvée pour cette sous-unité.

### 1.8 *Agents pharmacologiques modulateurs des canaux calciques de type L*

#### 1.8.1 *Dihydropyridines:*

Plusieurs dihydropyridines ont une très haute affinité de liaison pour le canal calcique de type L. Les composés bloquant les canaux calciques dépendant du voltage de type L ont démontré qu'il y avait une grande stéréosélectivité au site de liaison. Les antagonistes du calcium de type dihydropyridine, comme la nifédipine, ont été bien caractérisés comme étant de puissants inhibiteurs de la fonction des canaux calciques de type L. Ils possèdent des effets dépendant du temps ainsi qu'une grande affinité pour l'état inactivé du canal mais moins pour l'état fermé ou ouvert.

“ Dans toutes les préparations membraneuse des tissus étudiés jusqu'à présent, les études de liaison ont démontré un site de liaison de haute affinité liant les dihydropyridines de façon réversible. La constante de dissociation et la densité de récepteurs peuvent varier selon le ligand utilisé, la température, le tissu et le pH (44). Dans la plupart des tissus, la constante de dissociation pour la [<sup>3</sup>H]-nitrendipine ou pour

la [<sup>3</sup>H]-nimodipine varie entre 0.1 nM et 1 nM, en autant que la concentration des protéines ne soit pas trop élevée (154). Les études de compétition avec des dihydropyridines non tritiées ont généralement supporté le concept d'un site de liaison de haute affinité. L'utilisation d'énantiomères de dihydropyridines a confirmé la spécificité de la liaison en démontrant sa stéréosélectivité.

L'effet de la température sur la liaison de la [<sup>3</sup>H]-nitrendipine à des synaptosomes de cerveau de rat a été étudiée par Boles *et al.* (10). Ils ont observé que le K<sub>d</sub> (constante de dissociation) diminue avec la température, pour atteindre une valeur stable à 25 °C. Il demeure, par la suite, à ce niveau jusqu'à 0 °C. La densité de récepteurs ne variait pas selon la température.

Des études récentes ont démontré que l'inhibition des courants calciques par des dihydropyridines est modulée par le potentiel membranaire (4;134). Le bloc du courant est plus prononcé lorsque celui-ci est mesuré alors qu'on applique un potentiel de maintien dépolarisant en voltage-clamp. De même, dans des préparations n'étant pas en voltage-clamp, l'activité inhibitrice de ces composés est grandement influencée par le potentiel de repos de la cellule. Sanguinetti et Kass (134) ont proposé que l'hypothèse du récepteur modulé, qui explique le bloc des canaux sodiques par les anesthésiques locaux, pourrait être appliquée à l'inhibition des canaux calciques par les antagonistes du calcium. Cette théorie propose que la liaison d'un ligand à un site localisé à l'intérieur du canal est influencé par l'état du canal et que cet état est déterminé par le potentiel membranaire (voir ci-haut). Ce modèle prédit que le ligand ionisé ne peut avoir accès au site de liaison que par une voie hydrophile, celle-ci n'étant disponible que lorsque le canal est ouvert (134). Les ligands neutres peuvent atteindre ce site par voie

hydrophile ou hydrophobe à travers la membrane plasmique entourant le canal. Le vérapamil est chargé au pH physiologique de 7.4 tandis que la nifédipine et la nitrendipine sont neutres. Pour le vérapamil, l'inhibition est fréquence-dépendente car le stimulus de dépolarisation répété augmente la probabilité du canal d'être dans une conformation ouverte ce qui n'est pas le cas pour les agents neutres. Pour les dihydropyridines, la fréquence de stimulation est moins importante mais l'inhibition est dépendante du voltage car la voie d'accès hydrophobe est disponible à de faibles potentiels membranaires qu'augmentent la proportion de canaux inactivés (134).

### 1.8.2 Benzothiazépines:

Les benzothiazépines, comme le diltiazem, possèdent des sites de liaison distincts sur l'unité  $\alpha_1$  des canaux calciques dépendant du voltage de type L et ces sites sont liés de façon allostérique aux sites de liaison des dihydropyridines.

La liaison de la [<sup>3</sup>H]-diltiazem est stéréospécifique et réversible (45). Cette liaison est sensible à la température et aux ions divalents tel le calcium qui l'inhibe.

### 1.8.3 Phénylalkylamines:

Le site d'action des phénylalkylamines, comme la vérapamil, est distinct du site de liaison des dihydropyridines et des benzothiazépines mais est quand même lié à ces derniers.

Parmi les phénylalkylamines tritiées, la [<sup>3</sup>H]-desmethoxyverapamil semble être un ligand particulièrement intéressant démontrant une plus grande affinité et

une liaison non-spécifique moins élevée que la [ $^3\text{H}$ ]-vérapamil (35). La liaison de ces agents a été étudiée en profondeur sur les muscles squelettiques (41;51). La densité de récepteurs, lorsque mesuré avec ces agents, est très sensible à la température et, à basse température, est semblable à celui retrouvé lorsque des dihydropyridines sont utilisés (41). Le site de liaison des phénylalkylamines est stéréosélectif.

Contrairement à la liaison avec des dihydropyridines, la liaison avec les phénylalkylamines est diminuée en présence de cations divalents. L'affinité apparente du calcium pour le site inhibiteur est près du site de haute affinité du calcium retrouvé dans les expériences d'électrophysiologie (42). De plus, les ions monovalents tels le potassium et le sodium inhibent la liaison du vérapamil aux tubules T du muscle squelettique à ces concentration de 10 mM (36). Le GTP et l'ATP inhibent partiellement la liaison de la [ $^3\text{H}$ ]-vérapamil des tubules T (40). Les nucléotides diminuent la densité des récepteurs sans changer le  $K_d$  et augmentent la dissociation du complexe récepteur-vérapamil. Une transformation des sites de haute affinité à des sites de basse affinité est probablement responsable de cette diminution de la densité.

La dépendance au voltage de ces agents pourrait expliquer pourquoi ces agents sont plus puissants sur le muscle lisse vasculaire que sur le muscle cardiaque. En effet, sur les préparations de muscle lisse vasculaire, le potentiel de repos membranaire serait plus élevé que dans les cellules cardiaques.

### ***1.9 Objectifs du présent travail***

La femme enceinte subit d'importants changements physiologiques au cours de sa grossesse. Une hausse du volume sanguin, de la fréquence cardiaque, du volume d'éjection systolique ainsi qu'une diminution de la pression artérielle et de la

réactivité vasculaire aux agents vasoconstricteurs apparaissent pendant la grossesse. Malheureusement, la diminution de la pression sanguine et la diminution correspondante de la réactivité vasculaire ne s'installent pas toujours pendant la grossesse. Ces conditions amènent une hypertension de grossesse, la prééclampsie, conditions morbides pour la mère et l'enfant. Les mécanismes sous-jacents à ce syndrome ainsi que ceux qui président à la diminution de la pression sanguine pendant la grossesse normale ne sont pas complètement élucidés.

Afin de pouvoir traiter l'hypertension de grossesse, nous devons connaître les mécanismes responsables de la diminution de la pression sanguine lors de la grossesse normale. Parallèlement, la résistance aux effets des vasoconstricteurs peut être impliquée dans les mécanismes de diminution de résistance périphérique et donc de pression artérielle. Là encore, même si cette résistance a été substantiellement décrite, les mécanismes qui l'amènent n'ont pas été identifiés. Plusieurs auteurs ont montré que la diminution des récepteurs aux agents vasoconstricteurs ou un changement de la concentration plasmatique de vasoconstricteurs ou de vasodilatateurs endogènes ne contribuent pas à ces changements. Il est bien établi que pour contracter, le muscle lisse vasculaire nécessite l'apport de calcium extracellulaire. Nous croyons que cette mobilisation du calcium extracellulaire serait altérée lors de la grossesse (34;129). En effet, nous nous proposons de vérifier la dépendance au calcium de la contraction du muscle lisse vasculaire de la rate gestante ainsi que la fonction des canaux calciques dépendant du voltage, voie d'entrée importante de calcium extracellulaire. Nous utiliserons des méthodes pharmacologiques classiques qui nous permettront de

caractériser ces canaux, plus spécifiquement, les canaux calciques dépendants du voltage de type L, le type principal présent dans les cellules musculaires lisses vasculaires.

Nous utiliserons différentes concentrations de calcium afin de vérifier la dépendance de la contraction à cet ion lors de la gestation en comparaison à des témoins non-gestants. Si nous observons une différence, nous ciblerons les canaux calciques de type L à l'aide de dihydropyridines, modulateurs spécifiques de ces canaux. Nous vérifierons l'effet de ces composés sur la contraction vasculaire à deux agents contractiles. Nous utiliserons premièrement de la phényléphrine, agent contractile  $\alpha$ -adrénergique spécifique pour faire contracter les tissus. La phényléphrine agit sur des récepteurs ne sollicitant pas directement les canaux calciques de type L. Dans ce cas, nous ne devrions pas observer une grande différence entre les tissus provenant de rates gestantes et ceux provenant de rates témoins. Le deuxième agent contractile que nous utiliserons est un agent dépolarisant qui sollicitera directement les canaux calciques dépendant du voltage de type L, le chlorure de potassium (KCl). Si nous observons une différence de la modulation des canaux calciques dépendant du voltage lors de la gestation, nous vérifierons la densité et l'affinité de ces canaux lors de la gestation à l'aide d'études de liaison d'un agent tritié spécifique à ces canaux.

De plus, nous compléterons ces travaux en utilisant du  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  nous permettant d'observer l'entrée et la captation du calcium par les cellules musculaires lisses vasculaires.

À la suite de ces travaux, nous devrions être en mesure de confirmer ou d'infirmer notre hypothèse d'une altération de la mobilisation du calcium extracellulaire lors de la gestation.

## **2. ARTICLE 1**

**Publié dans *Biology of Reproduction*, 1999;60:979-988.**



**Résumé:**

Une diminution de la réponse aux agents vasopressifs survient lors de la grossesse. Nous avons vérifié l'implication de la mobilisation du calcium lors des réponses myotropiques des anneaux aortiques de rates vierges et gestantes. Les contractions des anneaux à la phényléphrine, en l'absence de calcium dans la solution physiologique, étaient plus basses sur les tissus de rates vierges que gestantes. La contraction à la phényléphrine des anneaux aortiques mesurée en l'absence de calcium s'est avérée plus grande chez la rate gestante que vierge. Cette observation n'existait pas lorsque le KCl servait d'agent stimulant. Le D-600, un bloqueur de canaux calciques de la famille des phénylalkylamines, a inhibé les réponses au  $\text{CaCl}_2$  de façon similaire dans les deux groupes d'anneaux étudiés. Le D-600 démontrait une inhibition de la réponse à la phényléphrine et au KCl proportionnellement à sa concentration dans le milieu physiologique. Par contre, l'effet du D-600 était moins efficace sur les tissus provenant des rates gestantes que vierges. La captation basale de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  était plus basse dans les anneaux aortiques de rates gestantes que vierges et le Bay K 8644 était incapable de renverser cette différence. La captation dans le temps du  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , basale et stimulée, était diminuée à tous les temps étudiés sur les anneaux aortiques de rates gestantes. De plus, lorsque les pools intracellulaire de calcium étaient vidés à la phényléphrine, le remplissage de ces pools était retardé dans les aortes de rates gestantes. Ces résultats indiquent une altération dans la mobilisation du calcium extracellulaire dans les anneaux aortiques de rates gestantes. Ces changements pourraient être dus à une modification fonctionnelle des canaux calciques dépendants du voltage lors de la gestation.

**Modulation of calcium mobilisation in aortic rings of pregnant rats: contribution of extracellular calcium and of voltage-operated calcium channels**

**Bertrand Roy, Benoit Sicotte, Michèle Brochu and Jean St-Louis.**

Laboratoire de Recherche en Pharmacologie Périnatale, Hôpital Ste-Justine and  
Departments of Obstetrics and Gynecology and of Pharmacology, University of  
Montreal

Correspondence must be addressed to:

Jean St-Louis, PhD

Centre de Recherche, Hôp. Ste-Justine

3175 ch. Côte Ste-Catherine

Montréal, PQ

H3T 1C5

Tel: (514) 345-4931 #2996

FAX: (514) 345-4994

E-mail: [stlouisj@ere.umontreal.ca](mailto:stlouisj@ere.umontreal.ca)

~

Short title: Calcium uptake in aorta of pregnant rats.

Key words: Calcium, pregnancy, dihydropyridines, calcium channels, aorta.

**Abstract:**

Pregnancy is associated with decreased vascular responsiveness to vasopressor stimuli. We have tested the involvement of  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization in myotropic responses of aortic rings obtained from pregnant and virgin rats. Contractions of the rings to phenylephrine, in the absence of calcium in the bathing medium, were lower in tissues from virgin than from pregnant rats. Concentration-response curves to  $\text{CaCl}_2$  that were measured after stimulation by phenylephrine in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  were shifted to higher levels of contraction. This was not observed when KCl was used to prestimulate the aorta. D-600, a phenylalkylamine calcium channel blocker, similarly inhibited these responses to  $\text{CaCl}_2$  in tissues from both pregnant and virgin animal. D-600 exerted a concentration-dependent inhibition of responses to phenylephrine and KCl. However, the calcium antagonist was less effective in aortic rings of pregnant than of virgin rats. Basal  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake was lower in aortic rings from pregnant than virgin rats and Bay K 8644 was unable to reverse this difference. Time course of basal and stimulated (KCl)  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx were lower in aorta of pregnant rats at all times studied. Moreover, when the intracellular calcium pools were emptied with phenylephrine, the refilling of these pools was delayed in aortic rings of pregnant rats. These results indicate an altered extracellular calcium mobilisation of aortic rings from pregnant rats. These changes may be due to a functional alteration of the voltage-operated calcium channels during pregnancy.

## INTRODUCTION:

Pregnancy is associated with haemodynamic changes such as reduced vascular resistance and blood pressure and increases in cardiac output and plasma volume [1]. The mechanisms for these changes are poorly understood and still under investigation. Diminished sensitivity to  $\alpha$ -adrenergic agonists and other vasoconstrictors on aortic vessels during pregnancy in the rat has been reported [2, 3]. In mesenteric resistance arteries, it was observed that reduced sensitivity to phenylephrine, an  $\alpha_1$ -adrenergic vasoconstrictor, was not mediated by endothelium derived relaxing factor (EDRF) or prostaglandins [4]. This indicates that endothelium, or at least EDRF, might not be the principal mechanisms involved in the blunted vasopressor responses in the vasculature during pregnancy.

Some mechanisms have been proposed to explain these changes during pregnancy [5, 6]. For instance, downregulation of membrane receptors for vasopressor ligands (AVP, norepinephrine, etc.) in vascular tissues, increased liberation of an endogenous vasodilator acting as physiological antagonist (prostacyclin, NO, etc.) to vasopressor, modifications of mechanical properties and/or tissue composition (ratio of smooth muscle to connective tissue, or of elastin to collagen, etc.) leading to increased compliance of vessels, and alterations (or uncoupling) of receptor-response coupling have been documented but this has not provided conclusive results so far.

Recently, we reported that functional involvement of voltage-operated calcium channels in myotropic responses to vasoconstrictors is impaired in aortic rings and mesenteric resistance arteries of pregnant compared to virgin rats [7, 8]. Calcium is

a major intermediate in the mechanisms that trigger contraction in vascular smooth muscle. An elevation in intracellular calcium allows the interaction of contractile myofilaments thus causing contraction [9]. Calcium required for this interaction comes from both intracellular stores and the extracellular space, the latter through calcium channels. In the present report, we tested the hypothesis that blunted responses to vasoconstrictor agents during normal pregnancy in the rat is linked to an altered mobilisation of extracellular calcium in vascular smooth muscle through voltage-operated calcium channels.

## MATERIAL AND METHOD:

### 2.1 Animals

Female Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, Qué.) aged 10-11 weeks were mated with age-matched males. The morning on which vaginal smears were found to contain spermatozoa was labelled day 1 of pregnancy. The pregnant females were then placed in individual cages until used on the 22<sup>nd</sup> day of gestation. Virgin rats of the same age served as controls without considering the stage of the oestrous cycle. The animals were housed in facilities of the Research Centre at Hôpital Ste-Justine, which is accredited by the Canadian Council on Animal Care. The protocol was approved by the local animal care committee.

### 2.2. Organ bath assay

After decapitation, the thoracic aorta was rapidly removed and placed in cold Krebs bicarbonate solution (KBS). It was cleaned of fat and extraneous tissues and cut into four consecutive rings (2-3 mm) which were mounted on stainless steel hooks and placed in individual jacketed tissue bath (10 mL, Radnotti Glass, Monrovia, CA) maintained at 37 °C. In order to exclusively study the regulation of Ca<sup>2+</sup> mobilization in smooth muscle of the vessels, the lumen of each ring was rubbed with a wooden stick to remove the endothelium. In each experiment, four rings of both virgin and pregnant rats were used. They were equilibrated for 60 minutes under 2.0 g passive tension, the optimal tension for both groups of tissues [2], with frequent washing and tension adjustment. The tissues were bathed in KBS of the following composition in mmol/L :

NaCl, 118; KCl, 4.65; NaHCO<sub>3</sub>, 25; CaCl<sub>2</sub>, 2.5; MgSO<sub>4</sub>, 1.18; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.18; and dextrose, 5.5. The solution was bubbled with a mixture of 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>, pH was 7.4. After equilibration, the tissues were challenged with 1.0 μmol/L phenylephrine. At plateau response, acetylcholine (0.1 mmol/L) was added to verify removal of the endothelium. Tension was measured by force-displacement transducers (FT-03, Grass Instruments, Quincy, MA) and recorded on a Grass polygraph (Model 7E) or computerised data acquisition system using Work Bench software (Kent Scientific, Litchfield, CT). The experiments with calcium channel blockers were performed under sodium lamp to prevent photodegradation of these substances.

### 2.2.1. Protocol

#### 2.2.1.1. Responses to phenylephrine in Ca<sup>2+</sup>-free KBS

In order to verify the involvement of extra- and intra-cellular Ca<sup>2+</sup> in the myotropic response to phenylephrine, aortic rings from virgin and pregnant rats were challenged with phenylephrine (20 nmol/L). After the response was obtained and reequilibration of tissues (~45 min.), the rings were bathed in Ca<sup>2+</sup>-free KBS (CaCl<sub>2</sub> omitted) for 15 minutes, then the effects of the same concentration of phenylephrine was measured. When this response had plateaued, CaCl<sub>2</sub> (2.5 mmol/L) was reintroduced in the bathing solution and response recorded. Aortic rings were allowed to reequilibrate for 90 minutes and the same protocol was again applied using phenylephrine 1.0 μmol/L as stimulant.

#### 2.2.1.2. Concentration-response curves to calcium

To evaluate the mobilization of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in myotropic responses and the involvement of voltage-operated calcium channels, concentration-response curves to  $\text{CaCl}_2$  were measured after application of phenylephrine or KCl in the absence of  $\text{CaCl}_2$  in the bathing solution. Four aortic rings from each virgin and pregnant rats were used, 2 rings of each group were challenged with phenylephrine and the other 2 with potassium chloride (KCl). Phenylephrine 20 nmol/L or 1.0  $\mu\text{mol/L}$  and KCl 20 or 80 mmol/L were used in normal KBS to obtain a control contraction. After 60 minutes of equilibration, the aortic rings were bathed in calcium-free KBS supplemented with 0.5 mmol/L ethylene glycol-bis(beta-aminoethyl ether)N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA). After 10 minutes, tissues were rinsed in the same solution for another 10 minutes, after which the solution was changed for only calcium-free Krebs (EGTA omitted) and the rings were challenged with the same concentration of phenylephrine or KCl. Tissues were washed with calcium-free solution, restimulated (after 15 minutes relaxation) with the same concentration of vasoconstrictor. When this response had stabilised, a concentration-response curve was constructed with  $\text{CaCl}_2$  (10  $\mu\text{mol/L}$  to 2.5 mmol/L). At the end of this protocol, tissues were washed with normal KBS and allowed to rest for 90 minutes. The same protocol was repeated except that the second application of the stimulant in calcium-free KBS was immediately followed by the addition of D-600, a phenylalkylamine calcium channel blocker. The concentrations of the blocker used were 30 nmol/L and 1.0  $\mu\text{mol/L}$  for KCl and phenylephrine stimulation, respectively.



### 2.2.1.3. Effects of D-600 on concentration-response curves to phenylephrine and KCl

In order to precisely evaluate the differential effects of D-600 on myotropic responses to receptor-stimulated and depolarization-induced myotropic responses, cumulative concentration-response curves to both phenylephrine ( $10^{-9}$  to  $10^{-4}$  mol/L) and KCl (2 to 100 mmol/L) were consequently measured in 4 adjacent aortic rings of both virgin and pregnant rats in the absence and the presence of different concentrations of D-600. The order of the stimulants alternated in each experiments. One of the tissues of each group used served as control while the other three were bathed in increasing concentrations of D-600 ( $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  and  $10^{-6}$  mol/L) applied 10 minutes before the first concentration of either phenylephrine or KCl. 90 minutes of equilibration was allowed between the measurement of the two concentration-response curves.

### 2.3. Calcium uptake and influx experiments

Measurements of  $^{45}\text{Ca}$  uptake was used to evaluate the contribution of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in myotropic responses. Aortic rings prepared as above were used in duplicate under a passive tension of 2.0 g. A modified version of the protocol of Meisheri et al. [10] was used. Briefly, the rings were suspended in tissue baths bubbled with 100%  $\text{O}_2$  in a physiological salt solution (PSS) of the following composition, in mmol/L : NaCl, 118; KCl, 4.65;  $\text{CaCl}_2$ , 1.5;  $\text{MgCl}_2$ , 1.0; dextrose, 11; and HEPES, 5; pH was 7.40 at  $37^\circ\text{C}$ .. After 1 hour of equilibration, the intended protocol was started.

In the first experiments, basal and stimulated  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake were measured by simultaneous exposure of aortic rings from virgin rats to  $0.5 \mu\text{Ci } ^{45}\text{Ca}^{2+}$  and

KCl (100 mmol/L). Stimulated  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake was measured in the absence and presence of calcium channel blockers: nifedipine (1  $\mu\text{mol/L}$ ), diltiazem (10  $\mu\text{mol/L}$ ), and verapamil (10  $\mu\text{mol/L}$ ).  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake was also measured in aortic rings or pregnant and virgin rats stimulated with phenylephrine (1  $\mu\text{mol/L}$ ), KCl (100 mmol/L) and Bay K 8644 (1  $\mu\text{mol/L}$ ). Each experiment included a basal uptake and a non-specific uptake (in the presence of  $\text{LaCl}_3$  50 mmol/L).

Time course studies for 1 to 30 minutes of basal and stimulated (KCl 100 mmol/L) calcium influx was assessed by exposing tissues to  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . It was also measured after attempting to empty phenylephrine-sensitive calcium pools by stimulating the aortic rings with 1  $\mu\text{mol/L}$  phenylephrine in a calcium-free PSS containing 2 mmol/L EGTA for 10 minutes. 2 times 20 minutes wash periods in calcium-free PSS followed. The stimulation with phenylephrine was repeated in the absence of EGTA. At the end of the last wash period, tissues were put in normal PSS containing  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (0.5  $\mu\text{Ci}$ ) for different periods of time (2 to 45 minutes).

After the protocol was completed, tissues were placed in ice-cold calcium-free PSS containing 50 mmol/L  $\text{LaCl}_3$  for 20 minutes. Rings were then blotted, weighted and dissolved in  $\text{H}_2\text{O}_2$ :perchloric acid 1:1 for 2 hours at  $37^\circ\text{C}$ . 5 mL of scintillation liquid (Ecolite (+), ICN, Montréal, Qué.) was added and radioactivity was counted in a  $\beta$ -counter (LS 500, Beckman, MA) with a counting efficacy of 50%. Specific uptake was calculated by subtracting non-specific (in the presence of  $\text{LaCl}_3$ ) from total uptake.

#### 2.4. Binding of [<sup>3</sup>H]-isradipine to aortic rings

Studies of [<sup>3</sup>H]-isradipine binding to intact aortic rings of rats were conducted following the method of Morel and Godfraind [11, 12]. These experiments were undertaken to verify if, in polarized preparations, binding of dihydropyridine was affected by polarization status of the cells. Aortic rings (used as triplicates) of each group were attached to a glass rod, to facilitate handling, and submerged, without applying passive tension, in PSS bubbled with 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub> of the following composition, mmol/L: NaCl, 122; NaHCO<sub>3</sub>, 15; KCl, 5.9; CaCl<sub>2</sub>, 1.25; MgCl<sub>2</sub>, 1.2; glucose, 11. Tissues were equilibrated for 60 minutes in PSS and then placed in normal PSS containing 40 pmol/L [<sup>3</sup>H]-isradipine for 45 minutes. Aortic rings were then transferred in baths containing 5.9 mmol/L to 100 mmol/L KCl for 45 minutes with 40 pmol/L [<sup>3</sup>H]-isradipine. After this incubation period, tissues were blotted dry, weighted, dissolved and counted as described above. All experiments had a non-specific binding group, e.g., in the presence of 1.0 μmol/L nifedipine for the two final incubations. Specific binding was obtained by subtracting the non-specific from the total binding for each group.

[<sup>3</sup>H]-isradipine total and non-specific binding was measured for different times. After the equilibration period, tissues were placed in normal PSS containing 0.5 pmol/L [<sup>3</sup>H]-isradipine for times between 15 and 90 minutes in baths containing 5.9 mmol/L and 100 mmol/L KCl. Non-specific binding kinetics was evaluated by the presence 1.0 μmol/L nifedipine in separated tubes.

## 2.5. Data analysis

Each concentration-curve was analysed by computer fitting to a 4-parameter logistic equation with the program Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) to evaluate the concentration producing 50% of the maximal response ( $EC_{50}$ ) and the maximum asymptote of the curve ( $E_{max}$ , maximum response). When phenylephrine was used to prestimulate tissues in measurement of concentration-response curves to  $CaCl_2$  (Fig. 2), the lower asymptote used was the stabilized residual response to phenylephrine. Different curves in the same protocol were compared by a two way ANOVA on mean  $pD_2$  (negative logarithm of the  $EC_{50}$ ), on mean  $E_{max}$  and on the lower asymptote of the curve (e.g. when required). Data are expressed as mean experimental points with their standard error (S.E.M.), together with the best fitted curve to these points.  $^{45}Ca^{2+}$  uptake and [ $^3H$ ]-isradipine binding data was compared using a two way ANOVA. Data were considered significant when a probability of smaller than 5% ( $p < 0.05$ ) was reached.

## 2.6. Chemical

All salts employed in these experiments were of analytical grade obtained from Fisher Scientific (Montréal, Qué.). Acetylcholine, HEPES, ethylene glycol-bis(beta-aminoethyl ether)N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) and  $LaCl_3$  were purchased from the Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO). Nifedipine hydrochloride, Bay K 8644 (methyl ester), phenylephrine hydrochloride, verapamil, D-600 and diltiazem were obtained from Research Biochemical International (RBI, Natick, MA).  $^{45}Ca^{2+}$  (~10 Ci/g) and Ecolite(+) was obtained from ICN (Montréal, Qué.). [ $^3H$ ]-isradipine (specific

activity 73 Ci/mmol) was obtained from Dupont Canada (Mississauga, Ont.). The dihydropyridines were prepared as stock solution in 95% ethanol in vials protected from light. Ethanol concentrations in the tissue baths did not exceed 0.1 % and were verified by adding the same concentrations of vehicle in control tissues.

## RESULTS:

Figure 1 shows reduced contraction to 20 nmol/L phenylephrine for aortic rings of pregnant compared to virgin rats under control conditions ( $1.77 \pm 0.07$  vs  $2.13 \pm 0.06$  g, respectively,  $p < 0.05$ ). On the other hand, contraction elicited with the same agent after 15 minutes in the absence of extracellular calcium in the bathing medium was significantly higher in aortic rings of pregnant than virgin rats ( $0.47 \pm 0.04$  vs  $0.36 \pm 0.03$  g, respectively,  $p < 0.05$ ). After the restoration of the calcium concentration to 2.5 mmol/L in the bathing medium, the contraction resumed to almost its initial level in both groups of aorta. Similarly, contractile response to 1  $\mu$ mol/L phenylephrine, in control KBS, was significantly reduced in tissues of pregnant compared to virgin rats ( $2.29 \pm 0.05$  vs  $2.63 \pm 0.06$  g, respectively,  $p < 0.05$ ), was higher in rings of pregnant compared to virgin in the absence of extracellular calcium ( $1.09 \pm 0.04$  vs  $0.98 \pm 0.05$  g, respectively,  $p < 0.05$ ) and almost resumed to their former state upon reintroduction of 2.5 mmol/L calcium. These results suggest that the contribution of intracellularly stored calcium to myotropic responses to phenylephrine is increased in aortic rings of pregnant compared to virgin rats, however this protocol did not allow to identify any change in extracellular calcium mobilisation.

To measure the contribution of extracellular calcium in the myotropic responses of aortic rings, concentration-response curves to  $\text{CaCl}_2$  were constructed in both groups of aortic rings in the absence and presence of D-600, a phenylalkylamine calcium channel blocker. Phenylephrine and  $\text{KCl}$  were both used at low ( $\sim \text{EC}_{50}$ ) and high (near maximal) concentrations to trigger contraction. These were applied in

calcium-free KBS, after changing the KBS from a calcium-free solution containing 0.5 mmol/L EGTA, according to the protocol described above. Figure 2 describes the results obtained with phenylephrine (upper panels) and with KCl (lower panels). When using phenylephrine (Figure 2A and 2B) in the absence of calcium, there was a residual contraction that was significantly greater in aorta of pregnant than of virgin rats as indicated by the lower asymptote of the curves, that is described by the first response to  $10^{-5}$  mol/L calcium. In both groups of aorta, this residual response to phenylephrine was markedly blocked by D-600 (1.0  $\mu$ mol/L, open symbols) to a similar magnitude in both groups of tissues. Nevertheless, the residual responses remained higher in aortic rings of pregnant than virgin rats. These residual contractions were not observed with KCl (Figure 2C and 2D).

When this residual contraction to phenylephrine had stabilised, a concentration-response curve to  $\text{CaCl}_2$  was measured. Each concentration of  $\text{CaCl}_2$  induced increases in tension that reached higher levels in tissues of pregnant than of virgin rats. Maximal contraction on these tissues was  $1.00 \pm 0.12$  vs  $1.32 \pm 0.11$  g ( $p < 0.05$ ) for virgin and pregnant rats with 20 nmol/L phenylephrine but were not different upon stimulation with 1.0  $\mu$ mol/L phenylephrine ( $2.66 \pm 0.11$  and  $2.41 \pm 0.10$  g, respectively, N.S.). Considering the difference in the starting level of each curve from aorta of virgin and pregnant rats, the spread between lower asymptote and maximal response was not statistically different. D-600 (1.0  $\mu$ mol/L) markedly reduced the effects of the concentration-dependent addition of  $\text{CaCl}_2$  to a similar level in both groups of aortic rings in both prestimulatory conditions. The larger responses to  $\text{CaCl}_2$  in aortic rings of pregnant than of virgin rats also appear to be dependent on a higher level of

residual contraction in the absence of calcium. Sensitivity to  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{pD}_{50}$ , i.e. negative logarithm of  $\text{EC}_{50}$ ) did not significantly vary in the two groups of aorta with the two concentrations of phenylephrine. These results suggest that once  $\alpha$ -adrenergic receptors are activated, sensitivity for calcium of the post-receptor coupling mechanisms is not modified in blood vessels by pregnancy. These results also support the observation of figure 1 that intracellularly stored calcium released by  $\alpha$ -adrenergic stimulation is increased in vascular smooth muscle of pregnant rats.

Similar experiments were performed with KCl (20 and 80 mmol/L) as the stimulating agent (Figure 2, C and D). Note that, in these experiments, D-600 was used at a much lower concentration, e.g. 30 nmol/L since it is much more potent when KCl is used as a stimulant (see figure 3). KCl, in the absence of extracellular calcium, did not elicit contraction, as shown by the lower asymptote of the concentration-response curves. When using 20 mmol/L KCl to pre-stimulate the tissues, contractions to  $\text{CaCl}_2$  were similar, except at the highest concentration of  $\text{CaCl}_2$ , in both groups of tissues. When D-600 (30 nmol/L) was added to the bathing solution, concentration-response curves to  $\text{CaCl}_2$  were similarly decreased on both tissues (Figure 2C). With 80 mmol/L KCl, maximal contraction to  $\text{CaCl}_2$  addition was similar in both groups of tissues. D-600 markedly reduced maximal contraction and sensitivity to  $\text{CaCl}_2$  in both groups of tissues (virgin  $2.43 \pm 0.11$  g and pregnant,  $2.59 \pm 0.06$  g, N.S.). D-600 seems to be similarly effective in both groups of tissues when KCl is used to trigger contractile mechanisms.

Concentration-response curves to phenylephrine and KCl were measured in the absence or presence of D-600 at different concentrations (Figure 3). On aortic



rings from virgin animals (Figure 3A), D-600 significantly reduced in a concentration-dependent manner, both maximal contraction and sensitivity (except at  $10^{-8}$  mol/L) to phenylephrine. Similar effects were observed on aortic rings from pregnant rats (Figure 3B). The decreased sensitivity to phenylephrine in the presence of D-600 was similar in aortic rings of pregnant and virgin rats, but a more important effect of the calcium channel blocker (at 0.1 and 1.0  $\mu\text{mol/L}$ ) was observed on maximum responses to phenylephrine in virgin compared to pregnant rats.

Control (absence of D-600) concentration-curve to KCl on tissues from virgin rats had a higher maximal contraction than the curve from pregnant rats ( $2.54 \pm 0.08$  vs  $2.25 \pm 0.11$  g, respectively,  $p < 0.05$ ). Each concentration of D-600 produced a significant progressive decrease maximal response to KCl on tissues from both groups of rats (Figure 3C and D). Sensitivity to KCl was not modified in the presence of D-600. The blocking effect of D-600 on maximum responses to KCl was slightly larger in aortic rings of virgin than pregnant rats.

The specificity of the  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake through voltage-operated calcium channels was assessed by stimulating the rings with 100 mmol/L KCl and blocking the uptake with 3 classes of calcium channel blockers: nifedipine (1  $\mu\text{mol/L}$ ), a dihydropyridine; verapamil (10  $\mu\text{mol/L}$ ), a phenylalkylamine; diltiazem (10  $\mu\text{mol/L}$ ), a benzothiazepine (Figure 4A).  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake increased more than twofold over basal uptake ( $180 \pm 26$  vs  $86 \pm 9$   $\mu\text{mol } ^{45}\text{Ca}^{2+}/\text{kg tissue (ww)}$ , respectively,  $p < 0.05$ ). The increase in  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake was completely blocked by the different voltage-gated calcium channel blockers used, nifedipine, verapamil and diltiazem, indicating the very high specificity for these drugs to block voltage-gated calcium channels.

Basal  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake was significantly lower in aortic rings of pregnant than of virgin rats (Figure 4B). Maximal stimulation with 100 mmol/L KCl or 1.0  $\mu\text{mol/L}$  phenylephrine increased  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake that reached for each stimulant, similar levels in tissues of virgin and pregnant rat. On the opposite, Bay K 8644, a dihydropyridine calcium channel activator, increased  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake in both groups of rings, but the difference between aorta of virgin and pregnant rats seen under basal conditions was maintained ( $p < 0.05$ ).

Time course of basal  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake was also measured in aortic rings of virgin and pregnant rats (Figure 5A). From 2 minutes up to 30 minutes, basal (not stimulated) uptake was significantly lower in tissues of pregnant than of virgin rats. Upon stimulation with 100 mmol/L KCl (Figure 5B),  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake increased markedly compared to the absence of stimulation (note the difference of the scale of the ordinate in both panels of Figure 5). Stimulated  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake was significantly decreased in tissues of pregnant compared to virgin rats. The results show that  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake was delayed, an effect that is observed on both basal and stimulated (100 mmol/L KCl) uptake.

$^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake was also measured after emptying phenylephrine sensitive calcium pools in calcium-free Krebs supplemented with 2 mmol/L EGTA. Upon simultaneous addition of 1.5 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  and  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , basal  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake was statistically lower in aortic rings of pregnant compared to virgin rats. Again, these results suggest that basal  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake is somewhat impaired in aortic rings of pregnant compared to virgin rats.

Such a finding could be explained by a difference in the equilibrium of activated to inactivated state of voltage-operated calcium channels in basal condition that will affect basal activity of the channel as well as binding of dihydropyridines on them [12]. To test such a possibility, we measured binding of a tritiated voltage-gated calcium channel blocker, [<sup>3</sup>H]-isradipine, in whole aortic rings of virgin and pregnant rats. The bathing solution had increasing concentrations of KCl to depolarise the tissues and thereby modifying calcium channel affinity for the tritiated ligand. We observed similar elevation in [<sup>3</sup>H]-isradipine binding directly proportional to the increase in concentration of KCl in the bathing solution for both groups of aorta (data not shown). Time course [<sup>3</sup>H]-isradipine binding was time-dependent (Figure 7) as shown by increased binding with time that was significant in the presence of 100 mmol/L KCl at all times. We also saw that the increase in binding in the presence of 100 mmol/L KCl was higher on tissues of virgin ( $0.98 \pm 0.15$  vs  $2.20 \pm 0.16$  fm/mg tissue, at 5.9 mmol/L and 100 mmol/L KCl, respectively,  $p < 0.05$ ) compared to pregnant rats ( $1.27 \pm 0.10$  vs  $1.78 \pm 0.15$  fm/mg tissue, at 5.9 mmol/L and 100 mmol/L KCl, respectively,  $p < 0.05$ ). Non-specific binding kinetic was similar in both groups of tissues and did not vary significantly over time (data not shown).

## DISCUSSION:

The purpose of this study was to investigate the postulate that the altered responses to vasoconstrictor agents during normal pregnancy in the rat are linked to altered mobilisation of extracellular calcium in vascular smooth muscle through voltage-operated calcium channels. The major findings were as follow: 1) contractions elicited by phenylephrine in the absence of extracellular calcium were higher in aortic rings from pregnant than virgin rats; 2) concentration-response curves to  $\text{CaCl}_2$  were similarly inhibited by D-600 on aortic rings of pregnant and virgin rats whatever the prestimulation used, phenylephrine or KCl; 3) D-600 blocked in a concentration-dependent manner the response to KCl and phenylephrine, more effectively in the former than the latter; 4) the blocking effect of D-600 on phenylephrine responses was more important in aortic rings of virgin than of pregnant rats; 5) BayK 8644-stimulated  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake was lower in tissues from pregnant rats; 6) Basal and stimulated (100 mmol/L KCl)  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake increased with time in both groups of aorta but was always lower in tissues from pregnant rats; 7) binding of [ $^3\text{H}$ ]-isradipine to whole aortic rings increased with the KCl concentration in the bathing medium and was higher in tissues of virgin than pregnant rats. These results strongly suggest that functional changes of voltage-operated calcium channels in the aorta of pregnant rats could be responsible for the altered responses to vasoconstrictors during this physiological condition.

Pregnancy-associated diminished responses to vasopressors have been consistently reported [3, 5, 13, 14], but the underlying mechanism have not been elucidated. The contraction of vascular smooth muscle induced by  $\alpha_1$ -adrenoceptor

activation is known to be caused by both calcium release from intracellular stores and calcium influx through calcium channels [15]. This increase in calcium acts on a complex cascade of enzymes that phosphorylate several elements of the contractile apparatus to cause contraction. In the present experiment, we observed, in the absence of extracellular calcium, increased responses to phenylephrine, an  $\alpha_1$ -adrenoceptor agonist, in aortic rings of pregnant compared to virgin rats (Figures 1 and 2). This residual contraction is apparently triggered by the release of intracellularly stored calcium, since also observed in the presence of EGTA in the bathing solution (Figure 2). The increased residual response in aorta of pregnant rats could be caused by a higher quantity of  $\text{Ca}^{2+}$  in intracellular stores, a facilitated  $\text{Ca}^{2+}$  release from these stores, or a higher inhibition of the reuptake mechanisms by the stores. However, Ezimokhai et al. [13] reported that the effects of phenylephrine, in the absence of extracellular calcium (+ EGTA), was similar in aortic rings of virgin and pregnant rats. It appears that their protocol did not allow for complete refilling of the intracellular pools before testing phenylephrine.

We have previously reported that extracellular calcium mobilization could be impaired during pregnancy [7, 8]. To evaluate the influence of extracellular calcium in the decreased vascular reactivity of gestation, we measured concentration-response curves to  $\text{CaCl}_2$  on aortic rings prestimulated, in the absence of  $\text{CaCl}_2$ , by receptor-dependent (phenylephrine) and voltage-dependent (KCl) stimuli (Figure 2). Our results did not provide evidence for altered extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization during pregnancy. However, they indicate that maybe the initial activation and/or setting of voltage-operated calcium channels are altered in blood vessels of pregnant rats. Ezimokhai et al.

[13] also reported concentration-response curves to  $\text{CaCl}_2$  after prestimulation (in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ ) with phenylephrine and KCl. They observed significantly greater responses for each  $\text{CaCl}_2$  addition in aortic rings from non pregnant than pregnant rats. Their experiments were carried out in intact aortic rings (endothelium present), while ours were performed on denuded preparations. It is suspected that this situation had an influence on the reactivity of the underlying smooth muscle, particularly upon reintroduction of calcium; an interpretation that was shared by these authors [13]. However, in the experiments reported here, endothelium-derived interacting influences are unlikely to interfere.

Calcium channel blockers bind to the voltage-operated calcium channels, and block voltage-dependent calcium influx. In so doing, they interfere with induced contractions [7, 16, 17]. The efficacy of D-600 was lower on tissues of pregnant rats under both phenylephrine and KCl (figure 3). The concentration-response curves to KCl in the presence of D-600 were similar to the ones we published earlier with nifedipine [7]. D-600, used in the present study, is a phenylalkylamine that binds to the  $\alpha_1$  subunit of the calcium channel but at a site different from nifedipine [18]. These results show that the two types of calcium channel blockers act in similar way and potency to block KCl responses. On the other hand, D-600 was clearly more efficient in the present study than nifedipine [7] to block responses to phenylephrine. Indeed, a concentration of D-600 33 times larger ( $1\mu\text{mol/L}$  vs  $30\text{nmol/L}$ ) was required to similarly block the  $\text{CaCl}_2$  responses with phenylephrine than KCl prestimulation (Fig. 2). This confirms the previous observation [7] that voltage-operated calcium channels are implicated at a given level of the myotropic response of the aorta to phenylephrine. This raises at least a

couple of question. Why would different calcium blockers have different efficacy against phenylephrine responses? Why are these blockers more efficient on  $\text{CaCl}_2$  responses after prestimulation with phenylephrine (Figure 2 a & b) than on direct responses to the agonist (Figure 3 a & b )? These questions remain to be fully investigated.

Calcium influx is needed for the tonic component of vascular smooth muscle contraction [13, 15]. It was reported that, when the concentration of  $\text{CaCl}_2$  in the bathing solution was reduced to 0.8 from 1.6 mmol/L, responses of aortic rings of pregnant rats to phenylephrine were less affected than the ones of their non-pregnant counterparts [13]. These authors concludes that the dependence of rat aorta on extracellular calcium for phenylephrine-induced contraction is diminished during pregnancy. Such decreased dependence on extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  seen in pregnancy, strongly suggest an impairment in the major calcium influx pathway, the voltage-operated calcium channels. Previous studies in our laboratory [7, 8] showed a decreased effect of calcium channel blockers of the dihydropyridine type on aorta and mesenteric resistance arteries during pregnancy. This could not be the result of regulation of voltage-operated calcium channels, since density and affinity of binding sites for [ $^3\text{H}$ ]-isradipine were not changed in membrane preparations of aorta [7] or mesenteric vasculature [8] of pregnant rats. Similar results were reported by Ikeda et al. [19] in tissues from spontaneously hypertensive and normotensive rats. These results show that physiological or pathological alterations of blood pressure do not involve a prior alteration of the density of voltage-gated calcium channels on the vascular smooth muscle. These results reinforce our belief that voltage-operated calcium channels are functionally altered

during pregnancy and that this mechanism could be responsible for blunted responses to vasoconstrictor associated with this condition.

Specific binding of [ $^3\text{H}$ ]-isradipine was examined over a wide range of KCl concentrations in the intact aorta from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats [12]. Their results indicated that proportions of 30% and 5% of calcium channels were in a high affinity state in aorta of Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats respectively under physiological conditions. We have performed similar experiments in aorta of pregnant and virgin Sprague-Dawley rats and did not observe any difference between the two groups of rats. On the other hand, the time course experiments, either in physiological or depolarizing (100 mmol/L KCl) PSS, showed that binding of [ $^3\text{H}$ ]-isradipine increased with time and was always significantly higher on aortic rings of virgin compared to pregnant rats (figure 7). This supports the concept of functional reduction of voltage-operated calcium channels in blood vessels of pregnant rats that is manifested by slower activation process.

When the cells are depolarised, the voltage-gated calcium channels open and extracellular calcium enters the cell [15, 19, 20]. To verify this aspect, we showed a total inhibition of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake induced by KCl with a variety of calcium blockers indicating that this influx was indeed mediated through such channels. Results of figure 5b support the interpretation that function of these channels is impaired during pregnancy. Indeed,  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake was stimulated by a dihydropyridine calcium channel activator, BayK 8644. Both basal and BayK 8644-stimulated  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake were significantly lower in aorta of virgin than of pregnant animals. We have previously reported that the contractile effect of BayK 8644 is markedly reduced during pregnancy



[7] and the present results suggest that this observation may be the consequence of reduced voltage-operated calcium channel function, since a reduced  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake with BayK 8644 was observed. Increase of the contractile effect of BayK 8644 was reported in aorta of rats with coarctation-induced hypertension indicating that a specific altered (increased) function of voltage-operated channel is linked to the development of hypertension in this model [21]. A similar mechanism, but of opposite direction, is proposed to occur during gestation by the present and previous [7] findings. The mechanism of this decreased calcium channel function suspected to be involved, can be a delayed activation of  $\text{Ca}^{2+}$  influx from extracellular milieu. Indeed, both basal and KCl-stimulated (figure 5)  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake were delayed in aorta of pregnant compared to non-pregnant rats. Moreover, when phenylephrine-sensitive intracellular calcium pools were previously emptied (figure 6), delayed uptake of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  was still observed in tissues of pregnant rats compared to non pregnant.

We have previously shown that the decreased effect of Bay K 8644 on aortic rings of pregnant rats can be modulated with KCl [7]. In the present study, we have observed a reduced BayK 8644-stimulated  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake on aortic rings from pregnant rats. Calcium channel modulators act by changing the opening probability of channels, activators (Bay K 8644) increasing and blockers (nifedipine) decreasing the probability [22]. In electrophysiological studies, dihydropyridine blockade of L-type calcium channels in vascular cells is enhanced by decreasing the holding potential [23]. These channels exist in three states: closed, activated and inactivated [24]. The time a calcium channel spends in a given state is regulated by membrane potential and the open configuration increases exponentially with membrane depolarization [25]. KCl acts by

modifying the membrane potential and hence the conformation of the voltage-operated calcium channels. This is probably the mechanism by which KCl re-establishes the effects of Bay K 8644 on aortic rings of pregnant rats [7], indicating that the absence of direct effect of Bay K 8644 in aortic rings of pregnant rats is caused by an increased membrane potential. It is considered that a hyperpolarization of 2 mV could decrease the probability of having open channels by around 30% [25], meaning that a greater proportion of the channels are in a closed state, the conformation of the channels to which blockers have the lower affinity [18]. It should be noted that Meyer et al. [26] have shown that smooth muscle of the rat mesenteric vascular bed are hyperpolarized by around 7 mV in pregnancy, observation that supports our interpretation.

Our study clearly demonstrates a decrease of reactivity to vasoconstrictor agents on isolated aorta from pregnant rats compared to virgin ones. The blunted responses to vasoconstrictors could be attributed to a decrease function of calcium channels through a delayed extracellular calcium uptake by vascular smooth muscle. This is suggested to result from a slower activation of calcium channel in vascular smooth muscle during pregnancy. Action of the calcium channel activator, Bay K 8644, could be modulated by KCl suggesting a change in membrane potential during pregnancy. The mechanism of these modifications remains to be investigated.

## Reference List

1. Capeless EL, Clapp JF. Cardiovascular changes in early phase of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161:1449-1453.
2. St-Louis J, Sicotte B. Prostaglandin- or endothelium-mediated vasodilation is not involved in the blunted responses of blood vessels to vasoconstrictors in pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166:684-692.
3. Massicotte G, St-Louis J, Parent A, Schiffrin EL. Decreased in vitro responses to vasoconstrictors during gestation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1987; 65:2466-2471.
4. Davidge ST, McLaughlin MK. Endogenous modulation of the blunted adrenergic response in resistance-sized mesenteric arteries from the pregnant rat. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:1691-1698.
5. Paller MS. Mechanism of decreased pressor responsiveness to ANG II, NE, and vasopressin in pregnant rats. *Am J Physiol* 1984; 247:H100-H108.
6. St-Louis J, Massicotte G, Parent A. Effet anti-hypertenseur de la grossesse: influence de la réactivité vasculaire. *Médecine/Science* 1988; 4:358-365.

7. Roy B, Sicotte B, Brochu M, St-Louis J. Effects of nifedipine and Bay K 8644 on myotropic responses in aortic rings of pregnant rats. *Eur J Pharmacol* 1995; 280:1-9.
8. St-Louis J, Pare H, Roy B, Brochu M. Decreased response to vasopressin in the mesenteric resistance arteries of pregnant rats: effects of nifedipine and Bay K 8644. *J Soc Gynecol Investig* 1995; 2:516-522.
9. Somlyo AV, Bond M, Somlyo AP, Scarpa A. Inositol trisphosphate-induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle. *Proc Nat Acad Sciences USA* 1985; 82:5231-5235.
10. Meisheri KD, Hwang O, Van BC. Evidence for two separated Ca<sup>2+</sup> pathways in smooth muscle plasmalemma. *J Membr Biol* 1981; 59:19-25.
11. Morel N, Godfraind T. Characterization in rat aorta of the binding sites responsible for blockade of noradrenaline-evoked calcium entry by nisoldipine. *Br J Pharmacol* 1991; 102:467-477.
12. Godfraind T, Morel N, Wibo M. Modulation of the action of calcium antagonists in arteries. *Blood Vessels* 1990; 27:184-196.

13. Ezimokhai M, Aloamaka CP, Cherian T, Morrison J. The role of extracellular calcium in pregnancy-induced attenuation of phenylephrine contraction in rat aorta with functional endothelium. *J Comp Physiol [B]* 1994; 164:81-87.
14. Parent A, Schiffrin EL, St-Louis J. Role of the endothelium in adrenergic responses of mesenteric artery rings of pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163:229-234.
15. Nishimura K, Ota M, Ito K. Existence of two components in the tonic contraction of rat aorta mediated by alpha 1-adrenoceptor activation. *Br J Pharmacol* 1991; 102:215-221.
16. Oriowo MA, Ruffolo RJ. Activation of a single alpha-1-adrenoceptor subtype in rat aorta mobilizes intracellular and extracellular pools of calcium. *Pharmacology* 1992; 44:139-149.
17. Beckeringh JJ, Thoolen MJ, de JA, Wilffert B, Timmermans PB, van ZA. Differential effects of the calcium entry blocker D 600 on contractions of rat and guinea-pig aortas, elicited by various alpha-1 adrenoceptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 229:515-521.
18. Nargeot J, Charnet P. Diversité moléculaire des canaux calciques: du gène à la fonction. *Médecine/Science* 1994; 10:1293-1308.

19. Ikeda S, Amano Y, Adachi-Akahane S, Nagao T. Binding of [3H](+)-PN200-110 to aortic membranes from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 1994; 264:223-226.
20. Godfraind T. Analysis of factors involved in the tissue selectivity of calcium antagonists. *Adv Exp Med Biol* 1992; 311:103-122.
21. Storm DS, Webb RC. Contractile responses to Bay K8644 in rats with coarctation-induced hypertension. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993; 203 :92-99.
22. Rapoport RM. Effects of norepinephrine on contraction and hydrolysis of phosphatidylinositols in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 242:188-194.
23. Mironneau J, Yamamoto T, Sayet I, Arnaudeau S, Rakotoarisoa L, Mironneau C. Effect of dihydropyridines on calcium channels in isolated smooth muscle cells from rat vena cava. *Br J Pharmacol* 1992; 105:321-328.
24. Hurwitz L. Pharmacology of calcium channels and smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1986; 26:225-258.
25. Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol* 1990; 259:C3-18.

26. Meyer MC, Brayden JE, McLaughlin MK. Characteristics of vascular smooth muscle in the maternal resistance circulation during pregnancy in the rat. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169:1510-1516.

Legends to figures

Figure 1. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$ -free KBS and of restauration of  $\text{CaCl}_2$  concentration on response of aortic rings of virgin (open columns) and pregnant (filled columns) rats to phenylephrine (20 nmol/L left; 1.0  $\mu\text{mol/L}$  right). The ordinate depicts responses to phenylephrine in g tension. Ten experiments were performed for each response; four tissues from the same rat were used. \*Statistical significance to  $p < 0.05$  by student "t" test independent variables.

Figure 2. Concentration-response curves to  $\text{CaCl}_2$  precontracted with phenylephrine 20 nmol/L (A) and 1  $\mu\text{mol/L}$  (B) and KCl 20 mmol/L (C) and 80 mmol/L (D) on aortic rings of virgin (circles) and pregnant (squares) rats in the absence (filled symbols) and presence (open symbols) of D-600 (30 nmol/L in A and B, 1.0  $\mu\text{mol/L}$  in C and D). The ordinate depicts responses of the aortic ring in g tension, while the abscissa shows the logarithm of the concentration of  $\text{CaCl}_2$  in mol/L. Ten experiments were performed for each response.

Figure 3. Concentration-response curves to phenylephrine (A, B) and to KCl (C, D) on aortic rings of virgin (A, C) and pregnant (B, D) rats in the absence (filled symbols) and presence (open symbols) of D-600. The ordinate depicts responses of the aortic ring in g tension, while the abscissa shows the logarithm of the concentration of the stimulant in mol/L. Ten experiments were performed for each response.

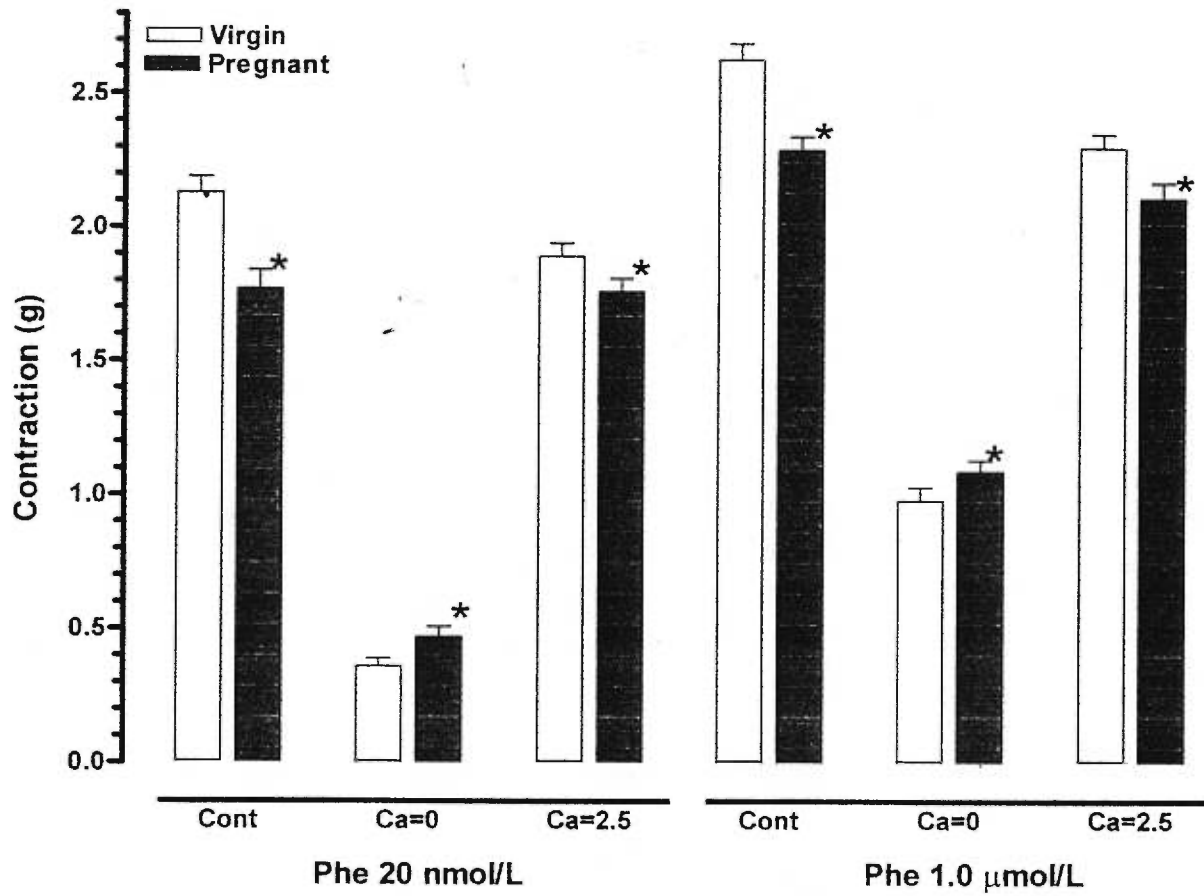


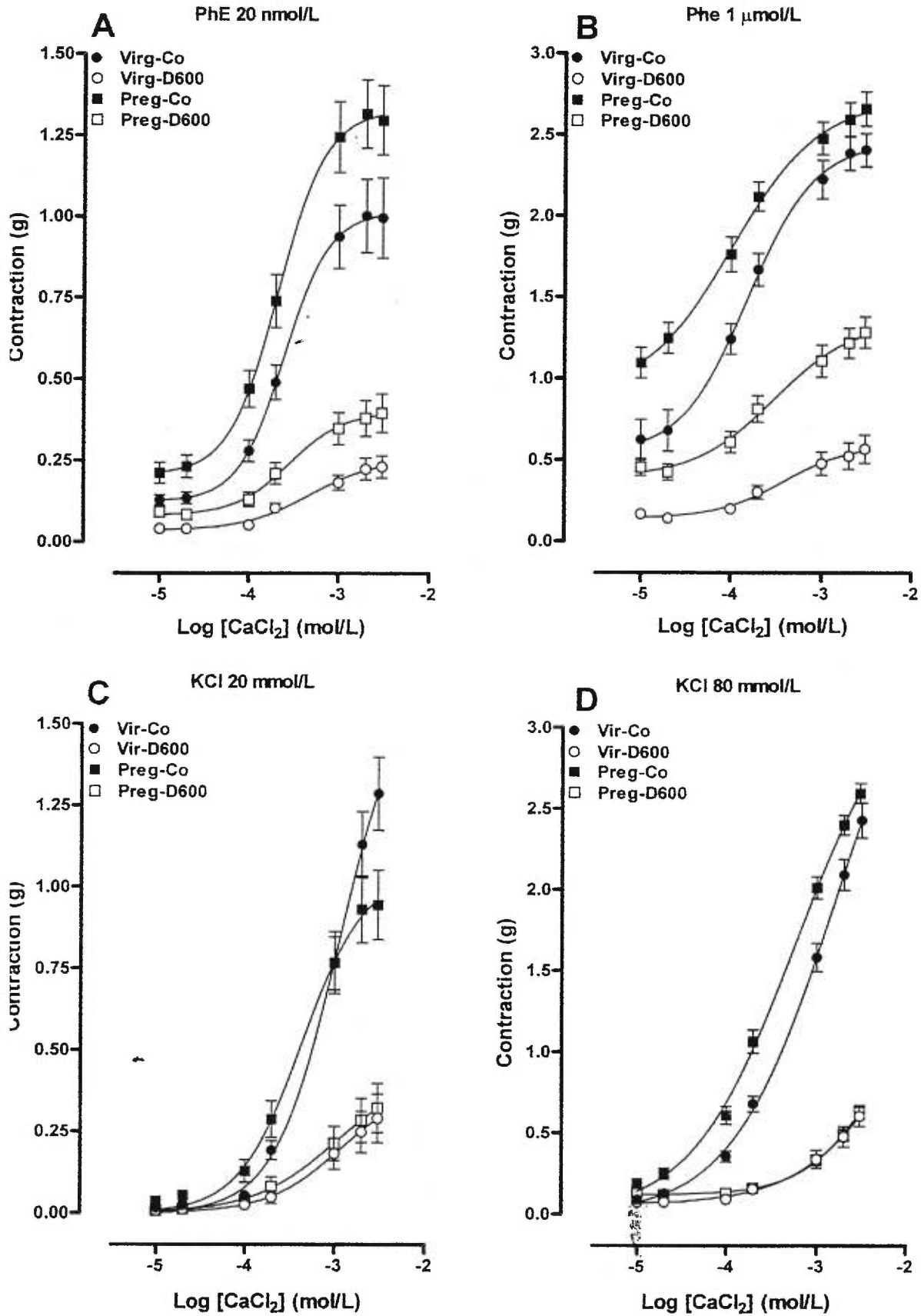
Figure 4. Specific basal and stimulated  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake in aortic rings of virgin and pregnant rats. A) specificity of stimulated (100 mmol/L)  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake in aortic rings of virgin rats is blocked by three types of calcium channel blockers, nifedipine (nif., 0.1  $\mu\text{mol/L}$ ), verapamil (vrap., 1.0  $\mu\text{mol/L}$ ) and diltiazem (dilt., 1.0  $\mu\text{mol/L}$ ). B)  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake in aortic rings of virgin (open bars) and pregnant rats (filled bars) in basal condition, and upon stimulation with KCl (100 mmol/L), phenylephrine (PhE 1.0  $\mu\text{mol/L}$ ) and Bay K 8644 (Bay K, 1.0  $\mu\text{mol/L}$ ). In panel A, basal and stimulated ring in the presence of the calcium channel blockers are statistically different ( $p < 0.05$ ) than with KCl alone. In panel B, asterisks depict statistical difference ( $p < 0.05$ , unpaired "t" test) from tissue from virgin animal in the same condition. Ten experiments were performed for each response.

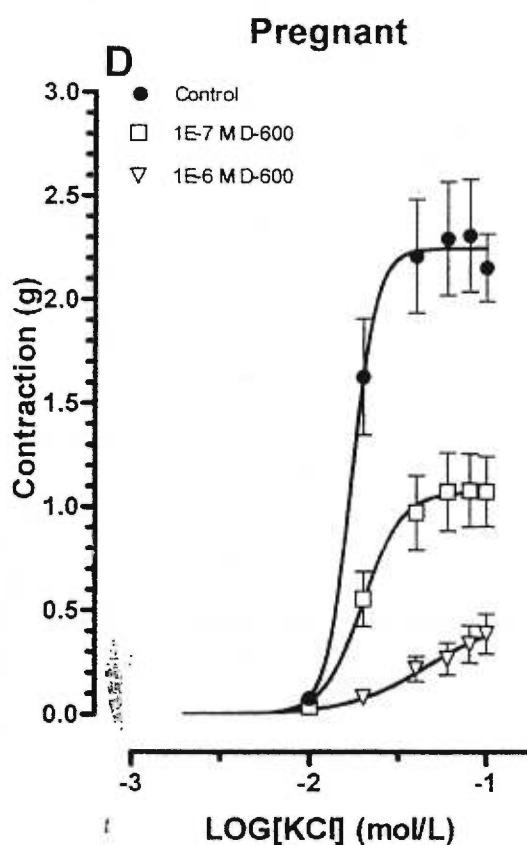
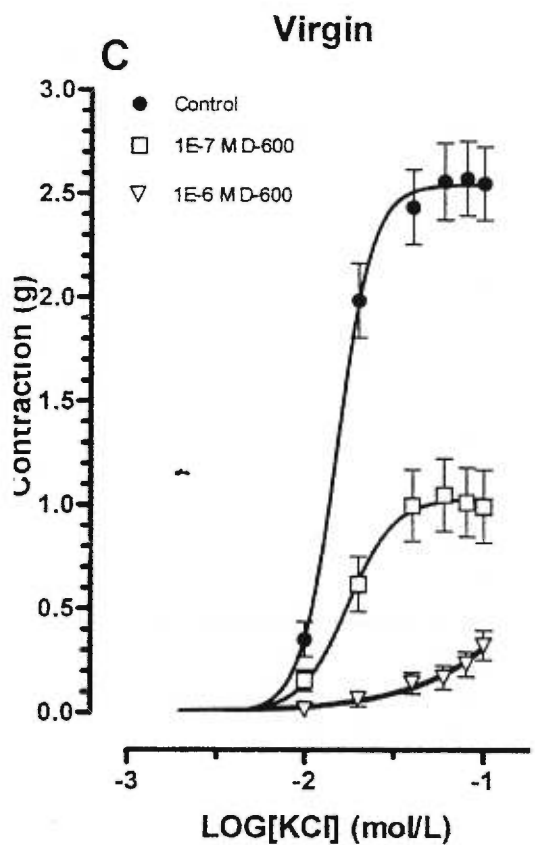
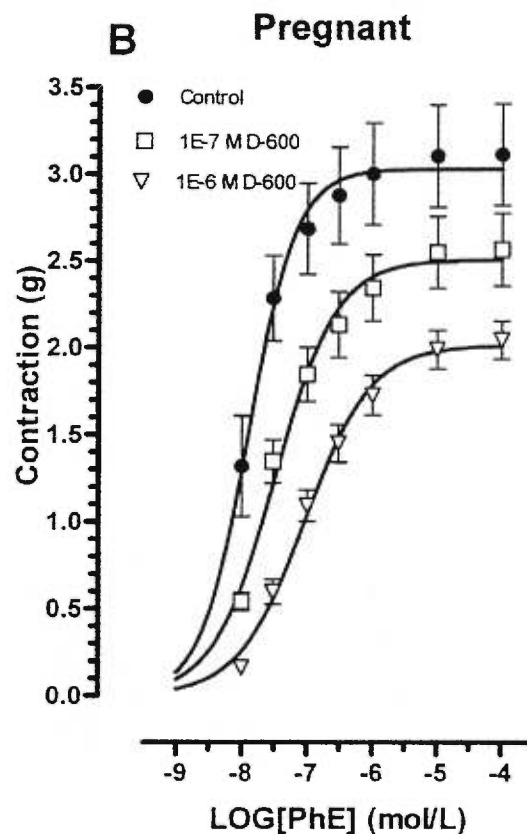
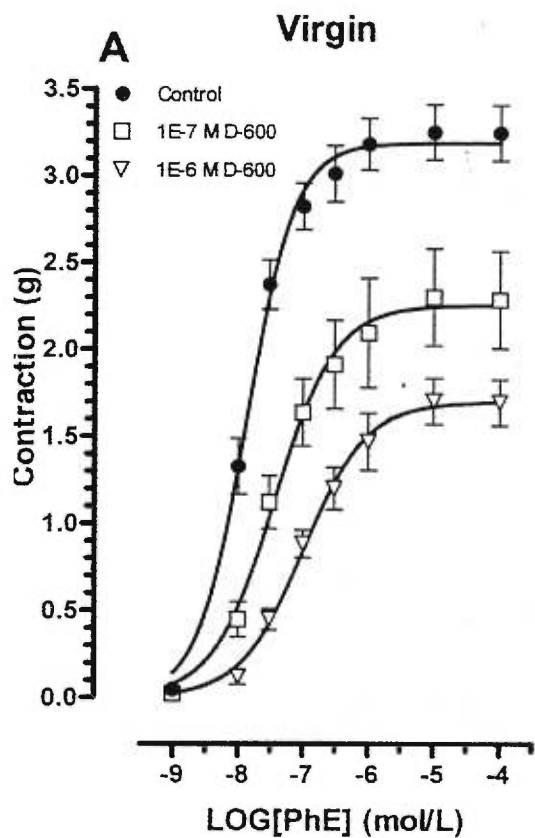
Figure 5. Time course of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake in aortic rings of virgin (open columns) and pregnant (filled columns) rats. Panel A represents basal and stimulated (KCl, 100 mmol/L) influx. Note the difference in the scale of the ordinate between the two panels. The ordinate depicts specific  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake, while the abscissa represents time in minutes. Ten experiments were performed for each response.

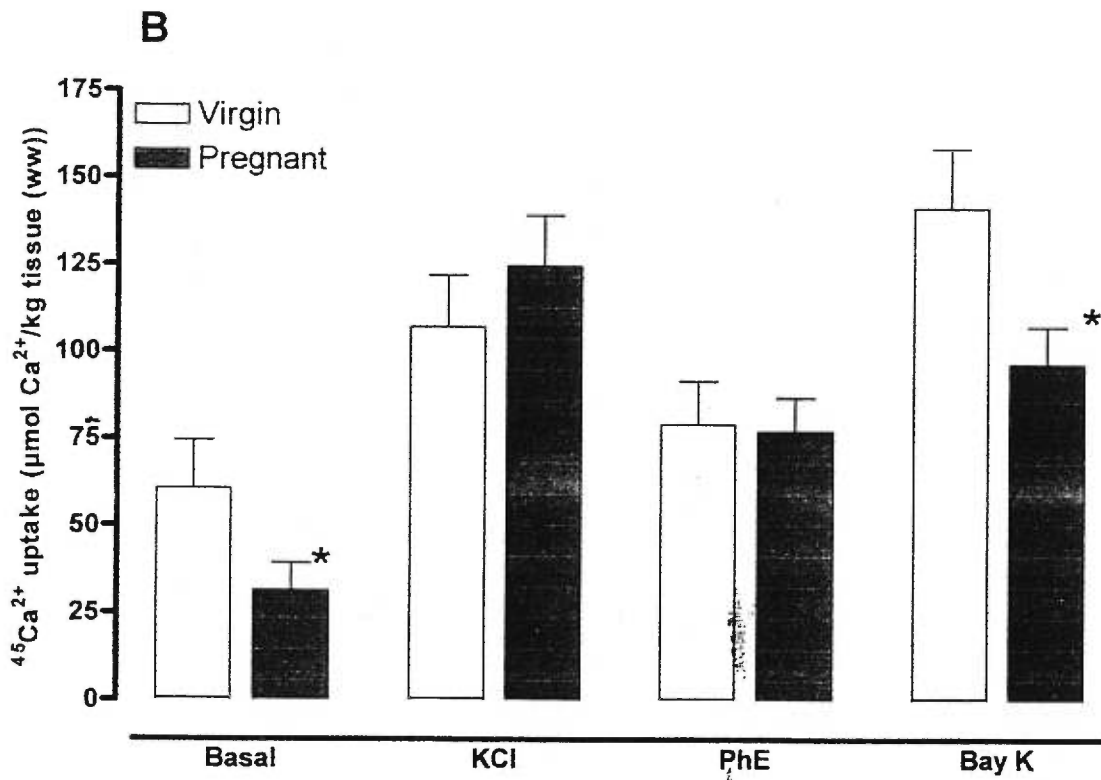
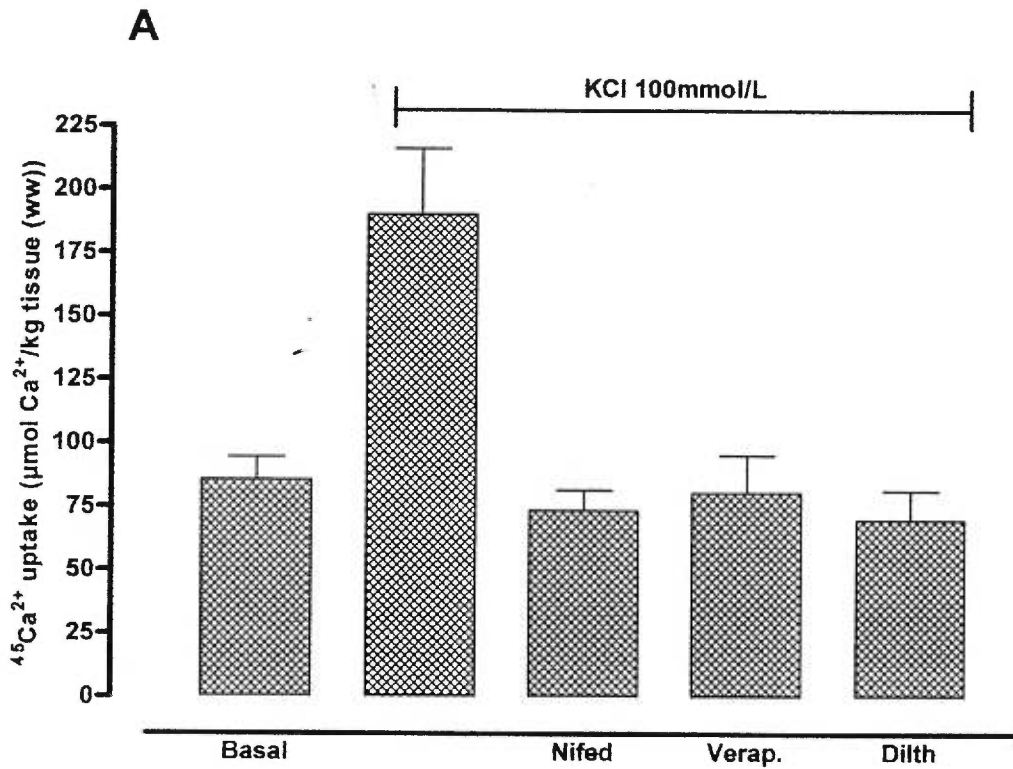
Figure 6. Time course of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake in aortic rings of virgin (open columns) and pregnant (filled columns) rats. Influx was assessed after emptying of intracellular calcium pools with phenylephrine. The ordinate depicts specific  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake, while the abscissa represents time in minutes. Ten experiments were performed for each response.

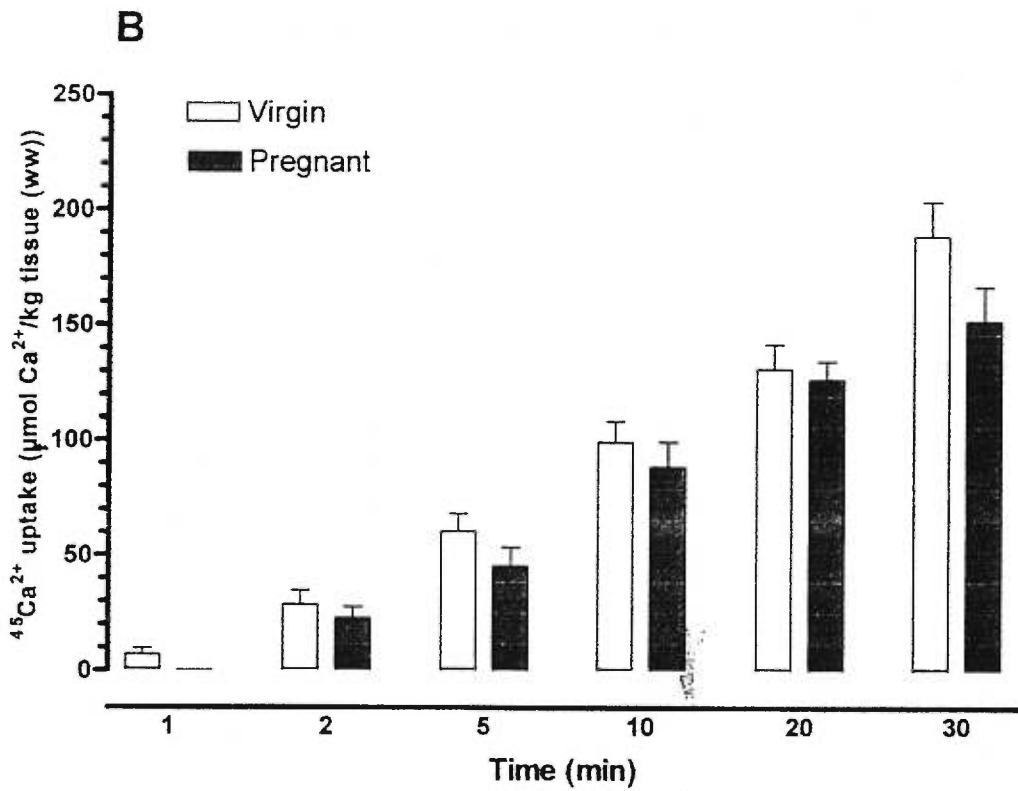
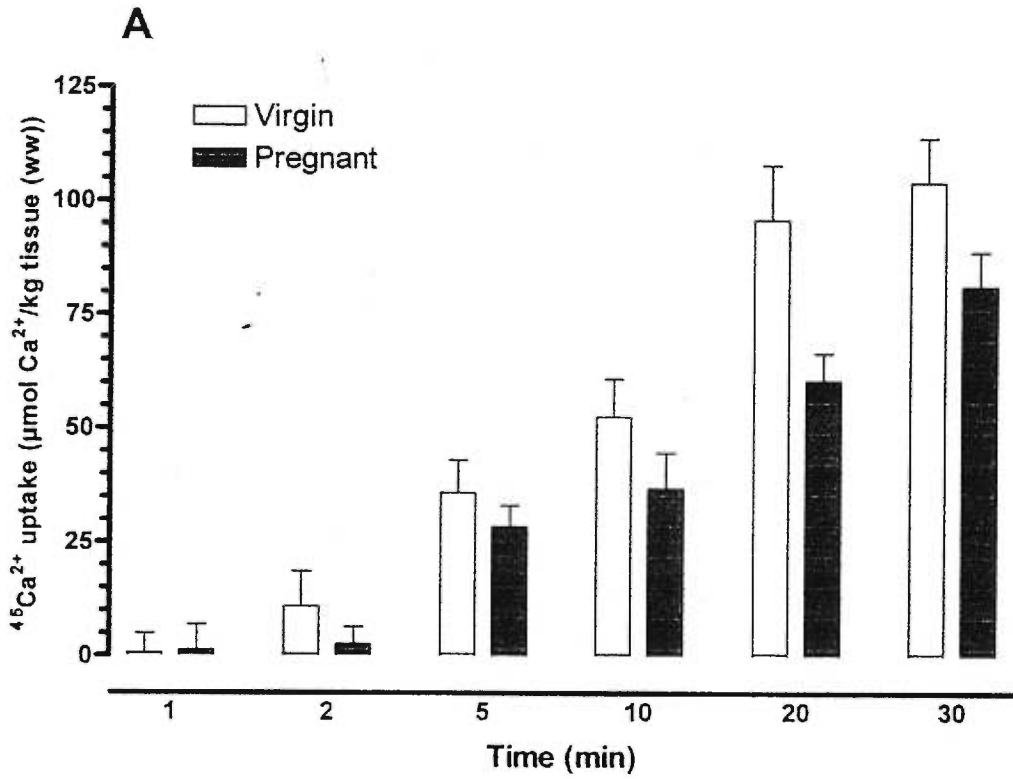
Figure 7. Time course of [ $^3\text{H}$ ]-isradipine binding on aortic rings of virgin (A) and pregnant (B) rats. Binding was assessed in normal (5.9 mmol/L KCl; open columns) and high potassium (100 mmol/L KCl; filled columns) KBS. The ordinate depicts specific binding of [ $^3\text{H}$ ]-isradipine, while the abscissa represents time in minutes. Ten experiments were performed for each response.

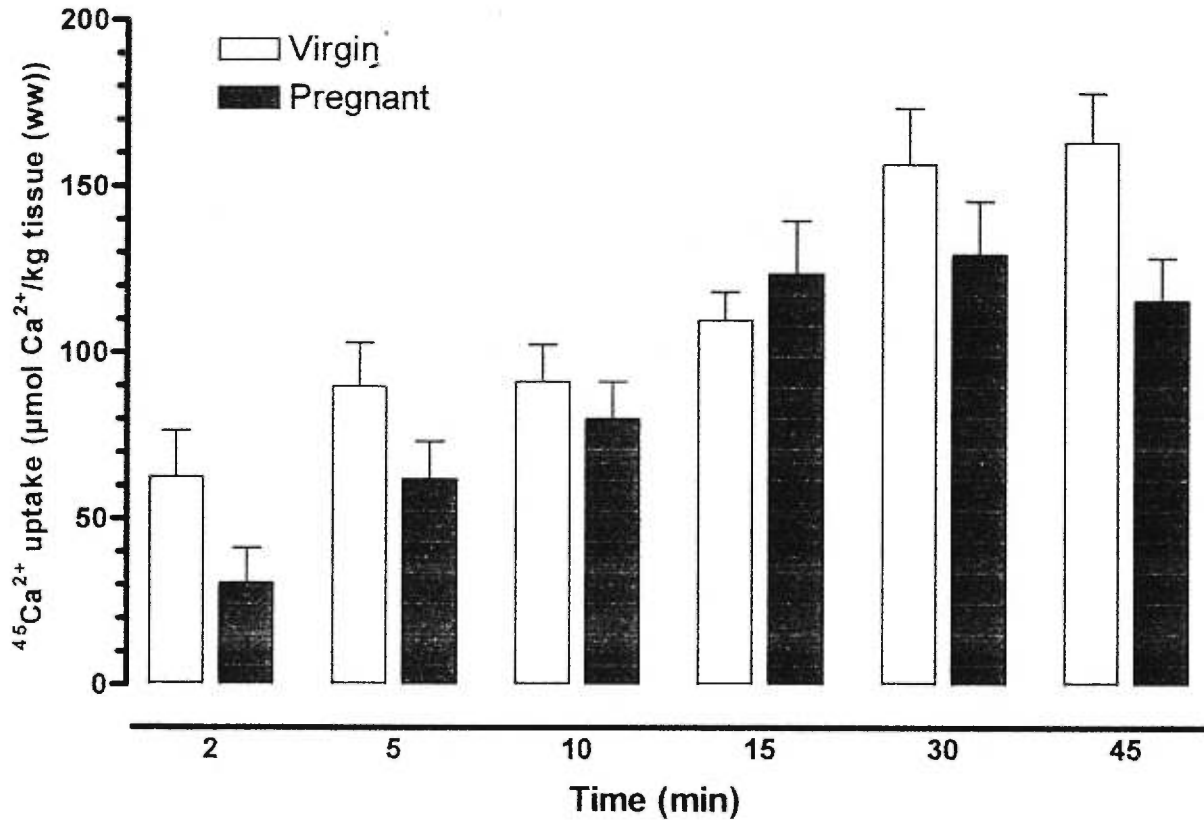




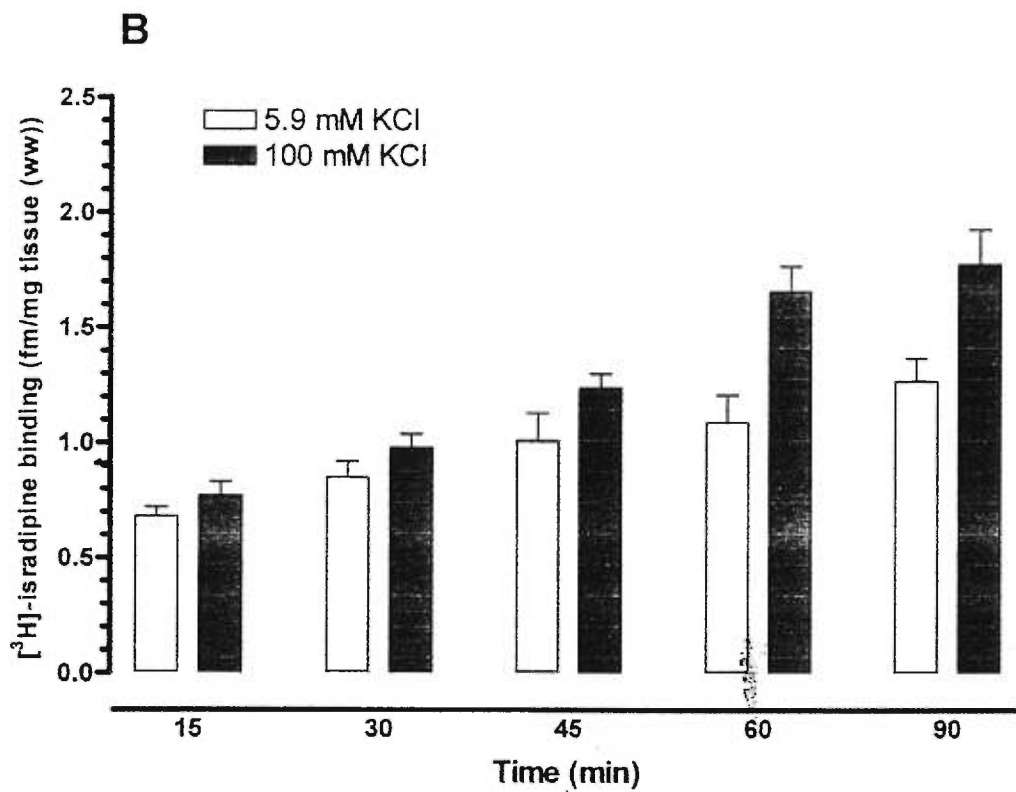
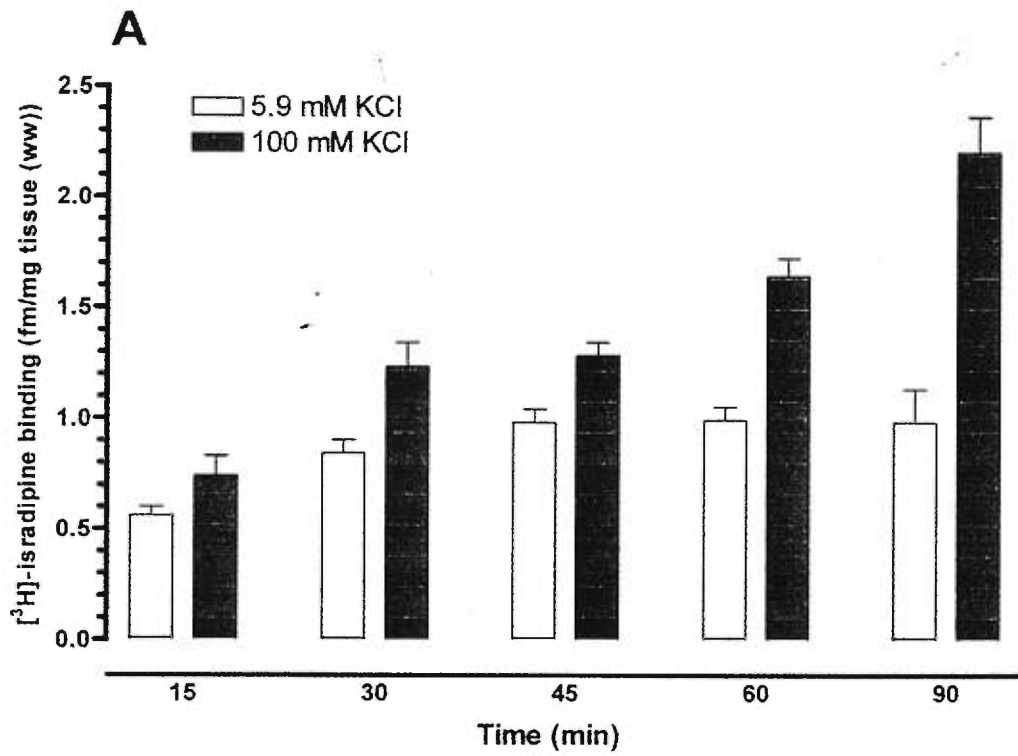












### **3. ARTICLE 2**

**Soumis à Biology of Reproduction**

Résumé:

Une diminution de la réponse des agents vasoconstricteurs accompagne la grossesse normale. Les mécanismes responsables de ce changement sont encore méconnus. L'utilisation d'anneaux aortiques de rates vierges et gestantes dans des bains à organes isolés nous a permis d'observer que les tissus provenant de rates gestantes étaient moins affectés par une diminution de la concentration extracellulaire de calcium dans le milieu physiologique que les tissus de rates vierges. La contraction maximale à la phényléphrine était significativement diminuée en présence de 1 mmol/L de calcium extracellulaire pour les tissus de rates vierges tandis que 0.5 mmol/L de calcium était nécessaire pour diminuer significativement cette réponse sur les anneaux aortiques de rates gestantes. La cinnarizine, un bloqueur de canaux calciques, était plus puissante à bloquer les réponses contractiles au KCl sur les anneaux aortiques d'animaux vierges ( $2.39 \pm 0.08$  vs  $2.18 \pm 0.08$  g,  $p < 0.05$ , en l'absence et en présence de  $0.1 \mu\text{mol/L}$  cinnarizine, respectivement) tandis que  $1 \mu\text{mol/L}$  était requis pour atteindre un seuil significatif sur les tissus de rates gestantes ( $2.08 \pm 0.05$  vs  $1.15 \pm 0.05$  g,  $p < 0.05$ , respectivement). La cinnarizine était aussi moins puissante sur les anneaux aortiques de rates gestantes à interférer avec les effets de la phényléphrine. L'amrinone, un bloqueur des canaux calciques opérés par un récepteur, a produit une réduction similaire de la contraction maximale à la phényléphrine et au KCl dans les deux groupes étudiés. L'IBMX, un inhibiteur non-spécifique des phosphodiésterases, était moins efficace à diminuer la contraction à la phényléphrine sur les anneaux aortiques de rates gestantes que vierges. Par contre, l'amrinone a diminué la captation de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  à la phényléphrine (1

$\mu\text{mol/L}$ ) des tissus de rates gestantes mais non de ceux de rates gestantes. Ces résultats suggèrent que la réponse pressive diminuée lors de la grossesse pourrait impliquer une diminution de la mobilisation du calcium extracellulaire et (ou) une fonction altérée des mécanismes contrevenants à la contraction vasculaire.

**Blunted vasoconstriction in aorta of pregnant rats: Involvement of cyclic nucleotide phosphodiesterase.**

Bertrand Roy, Michèle Brochu and Jean St-Louis.

Correspondence must be addressed to:

Jean St-Louis, PhD

Centre de Recherche, Hôp. Ste-Justine

3175 ch. Côte Ste-Catherine

Montréal, PQ

H3T 1C5

Tel: (514) 345-4931 #2996

FAX: (514) 345-4994

E-mail: [stlouisj@ere.umontreal.ca](mailto:stlouisj@ere.umontreal.ca)

Short title: Calcium and PDEs inhibition in pregnant rats.

Key words: Calcium, pregnancy, calcium channels, aorta, phosphorylation

**Abstract:**

Pregnancy is associated with decreased vascular responsiveness to many vasoconstrictors. The mechanisms underlying this phenomenon are still poorly understood. Using aortic rings of the thoracic aorta from virgin and pregnant rats in isolated organ baths, we observed that tissues from pregnant animals were less affected by decreasing the extracellular calcium concentration (from 2.5 mmol/L) in the physiological bathing medium. Maximal contraction ( $E_{max}$ ) to phenylephrine was significantly lowered in the presence of 1.0 mmol/L extracellular calcium in tissues of virgin rats whilst 0.5 mmol/L calcium was required to significantly lower  $E_{max}$  in tissues from pregnant rats. Cinnarizine (0.01 and 0.1  $\mu\text{mol/L}$ ), a voltage-operated calcium channel blocker, slightly but significantly blocked maximal response to KCl on aortic rings of virgin animals ( $2.39 \pm 0.08$  g vs.  $2.18 \pm 0.08$ g,  $p < 0.05$ ) while these concentrations were statistically ineffective on tissues of pregnant rats ( $2.08 \pm 0.05$  g vs.  $1.95 \pm 0.08$  g, N.S.). Cinnarizine was also less potent on aortic rings of pregnant rats to interfere with the effects of phenylephrine. Amrinone, a putative blocker of receptor-operated channels, produced similar reduction of  $E_{max}$  of KCl on aortic rings of pregnant and virgin rats but was much more potent to inhibit  $E_{max}$  of phenylephrine on aortic rings from virgin compared to pregnant animals. Similar results were obtained with IBMX, a non selective phosphodiesterase inhibitor. Amrinone decreased PhE ( $10^{-6}$  mol/L) stimulated  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake in aortic rings of pregnant but not virgin rats. These results suggest that the diminished vasoconstrictor response seen during pregnancy involves decreased mobilisation of extracellular calcium and/or some counteracting mechanisms mediating vasoconstriction.

**INTRODUCTION:**

It is well known that decreased blood pressure and vascular resistance and increased blood volume and cardiac output are normally observed during pregnancy. Moreover, pregnancy-related resistance to vasopressor stimuli has been also abundantly documented. However, the physiological mechanisms presiding to these changes are poorly understood and still under investigation. Mechanisms proposed to explain these changes, include: downregulation of membrane receptors for vasoconstrictors in blood vessels, increased liberation of a local endogenous vasodilator acting as a physiological antagonist to vasopressors, modification of mechanical properties of the vessel leading to increased compliance (1;2). Although these mechanisms may intervene, no evidence has been reported to support one of these as a major etiologic factor for reduced responses to vasoconstrictors. On the opposite, the involvement of mechanisms coupling vascular smooth muscle activation and contraction have been reported (3-5).

Increase of intracellular calcium within the cytosol is required to initiate contraction (1). Stimulation of a G-protein coupled receptor for vasoconstriction triggers a cascade of events, such as activation of phospholipase C (PLC) that converts phosphatidyl inositol phosphate ( $PIP_2$ ) into diacylglycerol (DAG) and inositol-1,4,5 triphosphate ( $IP_3$ ).  $IP_3$  induces the release of calcium from intracellular stores to initiate the contractile response. These initial events prompts the activation of membrane calcium channels, further increasing intracellular free-calcium concentration. Mobilisation of extracellular calcium may come through two pathways, one being the well characterised voltage-operated calcium channels (VOCC) and the other, the

functionally proposed receptor-operated calcium channels (ROCC). We have recently reported that the effects of calcium channel modulator of the dihydropyridine type, namely nifedipine and Bay K 8644, are altered in blood vessels of pregnant rats. This suggests that some basic alterations in mobilisation of extracellular calcium (5;6) through voltage-operated calcium channels could be an important mechanism involved in the blunted responses to vasoconstrictors accompanying normal pregnancy. However this alteration in calcium channel function was not related to reduced number of [<sup>3</sup>H]-nitrendipine binding sites (4;5). Alternatively, blunted responses to vasoconstrictors could be linked to the activation of some mechanisms that will counteract contraction in the vascular smooth muscle. cAMP (cyclic AMP) is one of the second messengers of vascular smooth muscle relaxation. It stimulates, through activation of protein kinase A, calcium extrusion from the cytosol to the extracellular milieu by stimulating Ca<sup>2+</sup>-ATPase pumps in the cell membrane and sarcoplasmic reticulum.. In so doing, it reduces the influence of MLCK (myosine light chain kinase) on the interaction of contraction proteins (7). Phosphodiesterases (PDEs) are a family of enzymes that hydrolyse cyclic nucleotides (cAMP, cGMP) to inactivate them (for review, see ref. (7)). PDEs prevent cAMP or cGMP uncoupling of MLCK thus maintaining smooth muscle contraction. Inhibitors of PDEs cause an accumulation of cAMP or cGMP that will favor relaxation of the vascular smooth muscle (8).

In the present report, we investigated the possible involvement of increased cyclic nucleotide influence as counteracting mechanisms for vascular smooth muscle contraction in the blunted responses to vasoconstrictors that accompanies normal pregnancy. To do so, we compared the effects of reduction of extracellular calcium



concentration with the effects of different substances that block voltage-dependent calcium channels (cinnarizine), the receptor-operated calcium channels (amrinone) and cyclic nucleotide phosphodiesterase. Therefore, we investigated the hypothesis that blunted responses of vascular smooth muscle to vasoconstrictor agents during pregnancy in the rat could be linked to an increased influence of mechanisms counteracting contraction in vascular smooth muscle.

## MATERIAL AND METHOD:

### 2.1 Animals

Female Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, Qué.) aged 10-11 weeks were mated with age-matched males. The morning on which vaginal smears were found to contain spermatozoa was labelled day 1 of pregnancy. The pregnant females were then placed in individual cages until used on the 22<sup>nd</sup> day of gestation (term 23 days). Virgin rats of the same age served as controls without considering the stage of the oestrus cycle. The animals were housed in facilities of the Research Centre at Hôpital Ste-Justine, which is accredited by the Canadian Council on Animal Care. The protocol was approved by the local animal care committee.

### 2.2 Organ bath assay

The rats were sacrificed by decapitation and the thoracic aorta was rapidly removed and placed in cold Krebs bicarbonate solution (KBS). It was cleaned of fat and extraneous tissues and cut into four consecutive rings (2-3 mm) which were placed in individual jacketed tissue baths (10 mL, Radnoti Glass, Monrovia, CA) maintained at 37 °C. The lumen of each ring was rubbed with a wooden stick to remove the endothelium. In each experiment, four rings of both virgin and pregnant rats were used. They were equilibrated for 60 minutes under 2.0 g passive tension, the optimal tension for both groups of tissues (10), with frequent washing and tension adjustment. The tissues were bathed in KBS of the following composition in mmol/L: NaCl, 118; KCl, 4.65; NaHCO<sub>3</sub>, 25; CaCl<sub>2</sub>, 2.5; MgSO<sub>4</sub>, 1.18; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.18; and dextrose, 5.5. The solution

was bubbled with a mixture of 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>; pH was 7.4. After equilibration, the tissues were challenged with 1.0 μmol/L phenylephrine. At plateau response, acetylcholine (0.1 mmol/L) was added to verify removal of the endothelium. Tension was measured by force-displacement transducers (FT-03, Grass Instruments, Quincy, MA) and recorded on a Grass polygraph (Model 7E) or computerised data acquisition system using Work Bench software (Kent Scientific, Litchfield, CT).

## 2.2.1 Protocol

### 2.2.1.1 *Effect of extracellular calcium concentration on vasoconstriction*

After return to baseline upon washing from the setup protocol just described, cumulative concentration-response curves to phenylephrine (1E-9 to 1E-4 mol/L) were obtained in the presence of different concentrations of extracellular calcium. One of the rings from both virgin and pregnant rats served as a control, while each of the others were bathed in KBS of different calcium concentrations (1.0, 0.5 and 0.25 mmol/L Ca<sup>2+</sup>). The KBS solution was changed from the normal KBS (containing 2.5 mmol/L Ca<sup>2+</sup>) 30 minutes before chartering the concentration-response curve.

### 2.2.1.2 Effect of cinnarizine, amrinone and IBMX on concentration-response curves to

~ KCl and PhE

A similar protocol was used to measure the effects of cinnarizine, amrinone and IBMX (1-methyl-3-isobutylxanthine) on cumulative concentration-response curves to potassium chloride (KCl, 2-100 mmol/L, added to normal KBS) and phenylephrine (1E-9 to 1E-4 mol/L). The second curve was chartered 2 h after completion of the first

curve. One of the rings of both virgin and pregnant rats served as a control, while each of the other three was pre-incubated with different concentrations of cinnarizine (0.01, 0.1, 1.0  $\mu\text{mol/L}$ ), amrinone (10, 30, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) or IBMX (3, 10, 30  $\mu\text{mol/L}$ ) added 10 min. before charting the curve. The order of the stimulants, KCl or phenylephrine alternated in each experiment. Aorta from different animals were used to measure the effects of the blockers.

### 2.3 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake experiments

Two aortic rings, prepared as indicated above, were used per experimental condition under a passive tension of 2.0 g. A modified version of the protocol of Meisheri et al. (11) was used (4). Briefly, the rings were suspended in tissue baths bubbled with 100%  $\text{O}_2$  in a physiological salt solution (PSS) of the following composition, in mmol/L : NaCl, 118; KCl, 4.65;  $\text{CaCl}_2$ , 1.5;  $\text{MgCl}_2$ , 1.0; dextrose, 11; and HEPES, 5. After 1 hour of equilibration, the experimental protocol was started.

Tissues were simultaneously exposed to 0.5  $\mu\text{Ci } ^{45}\text{Ca}^{2+}$  and stimulating agent (phenylephrine, 1  $\mu\text{mol/L}$ ) for 10 minutes to obtain control stimulated uptake of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Amrinone (0.1 and 0.5 mmol/L), in the absence and presence of phenylephrine, was added to separated tubes to measure their effects on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake. Each experiment included a non-stimulated uptake (basal) and a non-specific uptake (in the presence of  $\text{LaCl}_3$  50 mmol/L).

After the protocol was completed, tissues were placed in ice-cold calcium-free PSS containing 50 mmol/L  $\text{LaCl}_3$  for 20 minutes. Rings were then blotted, weighted and dissolved in  $\text{H}_2\text{O}_2$ :perchloric acid 1:1 for 2 hours at 37°C. 5 mL of

scintillation liquid (Ecolite (+), ICN, Montréal, Qué.) was added and radioactivity was counted in a  $\beta$ -counter (LS 500, Beckman, MA) with a counting efficacy of 50%. We subtracted non-specific  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx (in the presence of  $\text{LaCl}_3$ ) from the total influx to obtain specific influx in the tissues.

#### 2.4 Data analysis

Each concentration-curve was analysed by computer fitting to a 4-parameter logistic equation with the program Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) to evaluate the concentration producing 50% of the maximal response ( $\text{EC}_{50}$ ) and the maximum asymptote of the curve ( $E_{\text{max}}$ , maximum response). Different curves in the same protocol were compared by a two way ANOVA on mean  $\text{pD}_2$  (negative logarithm of the  $\text{EC}_{50}$ ), on mean  $E_{\text{max}}$ . Data are expressed as mean experimental points with their standard error (S.E.M.), together with the best fitted curve to these points.  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx data was compared using a two way ANOVA followed by a Dunnet's test. Data were considered significant when a probability smaller than 5% ( $p < 0.05$ ) was reached.

#### 2.5 Chemicals

All salts employed in these experiments were of analytical grade obtained from Fisher Scientific (Montréal, Qué.). Cinnarizine, amrinone, acetylcholine, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), HEPES, ethylene glycol-bis(beta-aminoethyl ether)N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) and  $\text{LaCl}_3$  were purchased from the Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO). Phenylephrine hydrochloride was obtained from

Research Biochemical International (RBI, Natick, MA).  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (specific activity 13 Ci/mmol) and Ecolite(+) was obtained from ICN (Montréal, Qué.). Cinnarizine was prepared in stock solution in 95% ethanol in vials protected from light. The effects of ethanol were verified by adding the same concentrations of vehicle in control tissues, but never exceeded 0.1 % (v/v) in the tissue bath.

## RESULTS:

Concentration-response curves to phenylephrine were constructed on aortic rings of virgin and pregnant rats bathed in KBS containing different concentration of  $\text{CaCl}_2$  (Fig. 1). Maximal contraction ( $E_{\text{max}}$ ) to phenylephrine was proportional to the concentration of calcium in KBS for aorta of virgin rats. Indeed the maximal response to phenylephrine was reduced from  $1.65 \pm 0.04$  g in the presence of 2.5 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  to  $1.32 \pm 0.03$  g,  $1.11 \pm 0.02$  g and  $0.91 \pm 0.01$  g when bathed in, respectively, 1.0, 0.5 and 0.25 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ . In aortic rings of pregnant rats, a different pattern of inhibition was obtained. The maximum response to phenylephrine was identical when aortic rings were bathed in 2.5 and 1.0 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  ( $1.52 \pm 0.04$  g and  $1.48 \pm 0.03$  g, respectively) while it was significantly reduced in the presence of 0.5 and 0.25 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  ( $1.16 \pm 0.03$  g and  $0.84 \pm 0.02$  g, respectively). Factorial analysis of variance revealed that indeed reduction of  $\text{CaCl}_2$  in the bathing solution reduced maximum responses to phenylephrine in the aorta of both groups of rats but also that the reduction of the maximum response to phenylephrine was different in aorta of non pregnant and pregnant rats. Sensitivity to phenylephrine ( $\text{pD}_2$ ) was decreased similarly in both groups of aorta in the presence of 0.5 and 0.25 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ .

Concentration-response curves to KCl and phenylephrine were measured in aortic rings of term-pregnant and virgin rats in the absence and presence of cinnarizine, a piperazine calcium channel blocker. Cinnarizine significantly decreased  $E_{\text{max}}$  to KCl in a concentration-dependent manner at all concentrations used in tissues from virgin animals (Fig. 2 A). This decrease was of low magnitude at 0.01 and 0.1

$\mu\text{mol/L}$  cinnarizine (from  $2.39 \pm 0.08$  g to  $2.18 \pm 0.08$  g and  $2.01 \pm 0.07$  g respectively,  $p < 0.05$ ) but was almost of 50% in the presence of  $1.0 \mu\text{mol/L}$  of the blocker ( $1.26 \pm 0.07$  g,  $p < 0.05$ ). In tissues from pregnant animals (Fig. 2 B), the two lower concentrations of cinnarizine ( $0.01$  and  $0.1 \mu\text{mol/L}$ ) did not affect  $E_{\text{max}}$  (from  $2.08 \pm 0.05$  g to  $1.98 \pm 0.06$  g and  $1.95 \pm 0.08$  g, respectively, NS), but at  $1 \mu\text{mol/L}$ , cinnarizine was effective in lowering  $E_{\text{max}}$  to KCl ( $1.15 \pm 0.05$  g,  $p < 0.05$ ). We observed a significant increase in sensitivity ( $pD_2$ ) to KCl in tissues from both virgin and pregnant rats as shown by the leftward shift of the concentration-response curves to KCl. This rise in sensitivity to KCl in the presence of cinnarizine was not concentration-dependent, and was highest at  $10 \text{ nmol/L}$  of the blocker and stayed elevated with its increasing concentrations. This effect was not significantly different in aortic rings of virgin and of pregnant rats.

Maximum response to phenylephrine was significantly and progressively decreased in the presence of cinnarizine in aorta of virgin rats reaching  $2.43 \pm 0.07$  g at  $1 \mu\text{mol/L}$  cinnarizine from  $3.13 \pm 0.10$  g (Fig. 2C). A decrease in maximal contraction on tissues from pregnant rats was observed only in the presence of the highest concentration of cinnarizine,  $1 \mu\text{mol/L}$  (Fig. 2D), from  $2.62 \pm 0.06$  g to  $2.43 \pm 0.07$  g,  $p < 0.05$ ). Sensitivity ( $pD_2$ ) to phenylephrine was reduced significantly by the presence of  $1 \mu\text{mol/L}$  cinnarizine in aortic rings of virgin (from  $7.71 \pm 0.07$  to  $7.41 \pm 0.07$ ,  $p < 0.05$ ) and of pregnant rat (from  $7.59 \pm 0.04$  to  $7.43 \pm 0.06$ ,  $p < 0.05$ ). These results show that the effects of cinnarizine were quantitatively different on the concentration-response curves to KCl and phenylephrine. Moreover, the effects of cinnarizine on maximum responses to both agonists were of lower magnitude in rings of pregnant compared to



virgin rats, indicating that voltage-operated calcium channels are impaired in aorta of pregnant rats.

Amrinone has been described as a phosphodiesterase inhibitor (12) and as a receptor-operated calcium channel blocker. We used amrinone, described as a receptor-operated calcium channel blocker (11;13;14) to discriminate extracellular calcium mobilisation induced by either depolarisation (KCl), that presumably involves voltage-operated calcium channels, and receptor stimulation (PhE), that is believed to activate the yet unidentified receptor-operated calcium channels. The effects of different concentrations of amrinone on concentration-response curves to KCl in aortic rings of virgin and pregnant rats are described in figure 3A and B. Amrinone progressively decreased maximum response to KCl in both groups of aorta. This inhibition of KCl responses was equivalent (by factorial analysis of variance) in the two groups ranging from 12 to 29% of the  $E_{max}$  obtained in the absence of the inhibitor. Amrinone also induced a right shift of the concentration-response curves to KCl. This progressive decrease in sensitivity was also similar in the two groups of tissues.

When the effects of amrinone were tested on the concentration-response curve to PhE (Fig. 3C, D), the inhibition was more important than on KCl responses, indicating that this substance is more effective on receptor- than depolarisation-induced contractions of the aorta. Moreover, the degree of inhibition of PhE responses was larger in aortic rings of non pregnant (Fig. 3C) than of pregnant (Fig. 3D) rats. Again, the antagonist also decreased sensitivity to PhE in a concentration-dependent manner, but this effect was equivalent in tissues of pregnant and non pregnant rats.

Amrinone has been described also as a non specific phosphodiesterase inhibitor (12). To discriminate between the involvement of receptor-operated calcium channels from the one of phosphodiesterase (PDE) in the inhibitory effects of amrinone, we tested 3-isobutyl-1-methyl xanthine (IBMX), a non specific PDE inhibitor, in a similar protocol. Figure 4 shows IBMX produced, as amrinone, a more powerful inhibition of phenylephrine than of KCl responses. The inhibitory effects of IBMX on KCl responses was, in terms of % reduction of Emax, equivalent for aorta of non pregnant and pregnant rats. On the opposite, IBMX produced a larger inhibition of phenylephrine responses in tissues of non pregnant than of pregnant rats, except at 3  $\mu\text{mol/L}$  IBMX where no effect was observed in aorta of non pregnant animals. IBMX similarly reduced sensitivity ( $\text{pD}_2$ ) to both stimulations in both groups of aorta.

Basal and stimulated  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptakes in the absence and presence of amrinone were assessed (Fig. 5). There was a significant decrease in uptake under basal conditions in aorta of pregnant compared to non pregnant rats (from  $92 \pm 13$  to  $66 \pm 11$   $\mu\text{mol Ca}^{2+}/\text{kg}$  tissue,  $p < 0.05$ ). This reduction in  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake in aorta of pregnant animals was maintained under all conditions tested. In the presence of 0.1 and 0.5 mmol/L amrinone, basal  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake was reduced in a similar fashion in both groups of tissues upon phenylephrine stimulation. These concentrations of amrinone, when phenylephrine was used as a stimulation agent, reduced uptake to lower than basal levels in tissues from pregnant rats but not in tissues from non pregnant rats. However, both concentrations of amrinone did not decrease  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake when KCl was used as a stimulating agent. When KCl was used, uptake did not increase beyond basal levels in aortic rings of pregnant rats in the absence or presence of amrinone while uptake was

significantly higher in tissues from non pregnant rats. Amrinone had no effect on this increase when KCl was used.

## DISCUSSION:

The purpose of the present study was to investigate one of the mechanisms that can reduce extracellular calcium mobilisation in vascular smooth muscle of pregnant rats, for instance, the involvement of cyclic nucleotides through inhibition of PDE. First, we observed that aortic rings of pregnant rats were less affected by a decrease of extracellular calcium than the aortic rings of non pregnant rats and that cinnarizine was more potent to block vascular smooth muscle contraction induced by phenylephrine in tissues from non pregnant than of pregnant rats. This confirmed previous observations of reduced mobilisation of extracellular calcium in blood vessels of pregnant rats (3-6). Secondly, we reported that amrinone, a potential inhibitor of the putative receptor-operated calcium channels that has inhibitory properties on PDE, effectively inhibited more efficiently the contractile responses to phenylephrine than the ones induced by KCl. Furthermore, this inhibitory effect of amrinone was more potent in aorta of non pregnant than of pregnant rats. We also report that basal and PhE-stimulated  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake were reduced on aortic rings of pregnant compared to virgin rats. Amrinone inhibited basal and phenylephrine-stimulated  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake. These results support the concept that an altered extracellular calcium mobilization contributes to the resistance to the pressor agents that accompany normal pregnancy. Our study provides some evidence that receptor-stimulated extracellular calcium mobilisation could be influenced by cyclic nucleotide levels within vascular smooth muscle.

Contraction of vascular smooth muscle is dependent, in part, on extracellular calcium, that is required to maintain contraction (15). As seen with the concentration-response curves to phenylephrine in the presence of different concentrations of extracellular calcium, aorta of pregnant rats are much less affected by the decrease of extracellular calcium than tissues of non pregnant animals. Indeed, lowering the concentration of extracellular calcium to 1,0 mmol/L produced a decrease in maximal responses to PhE in aortic rings of non pregnant animals while 0.5 mmol/L of CaCl in the bathing solution was required to do so in tissues of term-pregnant rats. Similar findings have been observed by Ezimokhai et al. (3) when reporting that the presence of 0.8 mmol/L calcium reduced maximal contraction to PhE in aortic rings of pregnant rats, but that this decrease was lower in aortic rings of non pregnant rats. Their results were obtained in the presence of functional endothelium and, since similar observations were obtained in both studies, it is suggested that the vascular endothelium does not play a major role in altered mobilisation of extracellular calcium in blood vessels of pregnant rats. Our results suggest that either modification of the influx pathway of extracellular calcium or alteration of the calcium handling within vascular smooth muscle cells occur during gestation in the rat.

To verify the first of these two possibilities, we used two substances described as calcium blockers, one at the level of the so-called voltage-operated, cinnarizine, and the other at the level of receptor-operated, amrinone, calcium channels. Cinnarizine effectively reduced the maximum response to KCl but was much less potent to block responses to PhE. There was also a reduction of its inhibiting effects on responses to phenylephrine in aortic rings of pregnant rats but much less for the

responses to KCl. These results are similar (although not identical) to the ones previously obtained with nifedipine (6), a dihydropyridine calcium blocker, and D-600 a phenylalkylamine (4). Nifedipine (6) and D-600 were much more efficient than cinnarizine (Fig. 2) to reduce the maximum responses to KCl. For the responses to phenylephrine, a different pattern was observed. Indeed, D-600 was the most potent to block phenylephrine induced contraction while nifedipine was the least effective, closely followed by cinnarizine. Concerning responses to the aorta, the most striking effects were observed with nifedipine on phenylephrine induced contractions. Indeed, while nifedipine induced some effects on phenylephrine responses in aorta of non-pregnant animals, it has no effects on aorta of pregnant rats. With D-600 (Fig. 4) and cinnarizine (Fig. 2), decreased inhibitory effects were observed on responses to phenylephrine in aorta of pregnant animals. A similar profile is observed on KCl-induced contractions but the differences between pregnant and non pregnant are somewhat less important than with phenylephrine. These data suggest that there are indeed alterations of voltage-operated calcium channels in blood vessels of pregnant rats but the nature of these alterations appear to be dependent on the type of voltage-operated calcium blocker used.

With a dihydropyridine calcium channel activator, Bay K 8644, we have previously observed an absence of direct contractile response to this activator in aortic rings of pregnant rats while a significant vasoconstriction was observed in tissues of non pregnant animals (6). This effect also appears to be tissue dependent since a direct vasoconstriction to Bay K 8644 was not observed in mesenteric resistance arteries of pregnant and non pregnant rats (Paré and St-Louis, unpublished) while both nifedipine and Bay K 8644 were more potent in mesenteric arteries of non pregnant than pregnant

rats to respectively inhibit and potentiate responses to vasopressin (5). Thus, we have observed that altered function of voltage-operated calcium channels in pregnancy is present in aorta ((4, 6), current report), mesenteric resistance arteries (5) and in adrenal glomerulosa (16). Furthermore, Ezimokhai et al. (3) also reported similar results to our present observations. Indeed, this group observed that diminution of extracellular calcium concentration in the bathing medium had a smaller incidence on the contraction of aortic rings of pregnant than on those from non pregnant rats.

Amrinone was used as receptor-operating calcium channel (ROC) blocker (11, 13, 14). Although those channels have not been identified, so far, by molecular and biophysical methods, numerous functional observations support their presence in several tissues including smooth muscle (24). Meshieri et al. (14) demonstrated that a high concentration of amrinone (0.43 mmol/L) completely blocks contractions to norepinephrine and KCl. We did not obtain such a large inhibition of maximal responses to phenylephrine and KCl with amrinone at concentrations up to 0.1 mmol/L. However, amrinone demonstrated a larger inhibition of the response to phenylephrine than to KCl (Fig. 3). In  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake experiments, it also decreased the phenylephrine-stimulated but not the KCl-stimulated calcium uptake (Fig. 5). These results are in full agreement with the ones reported by other investigators (13, 14) and support the concept that amrinone is a more potent antagonist of receptor-stimulated than depolarisation-induced contractions by opposition to the more classical calcium channels blockers of dihydropyridine (6), phenylalkylamine (4) or cinnarizine (Fig. 2) types.

Amrinone also demonstrated a different type of blockade in aortic rings of non pregnant and pregnant rats. It significantly decreased maximum responses to

phenylephrine in aorta of non-pregnant and pregnant rats. It significantly decreased maximum responses to phenylephrine in aorta of non-pregnant rats, was much less efficient to do so in tissues obtained from pregnant animals. In this last condition, its major effect was on reduction of sensitivity (increased  $EC_{50}$ ), not on maximum response. Responses to KCl were not differently affected by the antagonist in the two groups of aorta. An equivalent reduction of the effects of amrinone on phenylephrine-induced  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake in the two groups of rats (Fig. 5), no effect was observed in KCl-stimulated calcium uptake. Stice et al. (13) reported similar results in the uterine vasculature of the pig. This suggests that the effects of amrinone on agonist-induced contractile responses may reside at a site different than calcium uptake mechanisms.

Amrinone has been shown to inhibit phosphodiesterase (12). Activation of the  $\alpha$ -adrenergic receptor causes the activation of phospholipase (PLC) which produces  $\text{IP}_3$  causing the release of intracellular calcium from intracellular stores and this initiates vascular smooth muscle contraction. To counteract this phenomenon and get the vascular smooth muscle to a resting state, a relaxation cascade is initiated by elevation of cyclic nucleotides (cAMP and cGMP) (for review, (18)). Upon inhibition of phosphodiesterase, cAMP accumulates in the vascular smooth muscle, inactivating MLCK and in stimulating membrane calcium pumps will favour calcium extrusion, reducing the level of contraction (14;19;20). Thus, the inhibitory effects of amrinone on agonist-induced contractions in aortic rings of the rat could be due to an action on phosphodiesterase that, indirectly, will increase extrusion of intracellular calcium.

The experiments with IBMX (Fig. 4) support the interpretation that amrinone interferes with PhE-induced contractions by an unidentified mechanism



involving intracellular levels of cyclic nucleotides. Indeed, the effects of both antagonists (amrinone and IBMX) are qualitatively similar in respect to relative inhibition of KCl vs PhE responses. It could imply that PDE is activated by PhE (not by KCl) stimulation to prevent the opposing effects of basal, or indirectly increased, production of cyclic nucleotides. Lugnier et al. (21) reported that the non specific PDE inhibitor IBMX, in a concentration of 500  $\mu$ M, caused a sevenfold elevation of cAMP and cGMP in vascular smooth muscle cells of rats. Taylor et al. (22) also reported that IBMX can depress maximal tension and sensitivity in rat mesenteric vessels to norepinephrine, suggesting an action of IBMX on the intracellular calcium concentration. Similar decrease in sensitivity to norepinephrine by IBMX was also seen in mesenteric resistance arteries (22). We did not see this decrease in sensitivity with IBMX in our study. The combination of these results (Fig. 4, ref. 21) suggests a decrease influence of phosphodiesterase in blood vessels during pregnancy. The exact mechanism involved in these process remains to be elucidated, but it was shown that an increase in cAMP can lead to activation of the reticulum calcium pump thereby increasing sequestration of calcium in calcium intracellular pools or its extrusion (23).

This study demonstrates that the decrease in reactivity to vasoconstrictor agents on isolated aortic rings of pregnant rats is associated with decreased mobilisation of extracellular calcium in vascular smooth muscle. These changes are reported here, to be linked to a decreased inhibitory activity of cinnarizine, a blocker of voltage-operated calcium channels, of amrinone, a putative blocker of receptor-operated calcium channels and of PDE and of IBMX, a non specific inhibitor of PDE. It is concluded that the

blunted responses to vasoconstrictors could be linked to an increase presence of cyclic nucleotides (cAMP) that could favor calcium extrusion and reduction of intracellular free calcium concentration.

**Acknowledgments:**

We would like to thank Mr. Benoît Sicotte and Ms. Dominique Perron for valuable assistance in some of the results presented here. This work was supported by an operational grant from the Medical Research Council of Canada (MRC). Bertrand Roy held a studentship from the Fond de Formation de Chercheurs et Aide à la Recherche du Québec. Michèle Brochu holds a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

## Reference List

1. Somlyo AV, Bond M, Somlyo AP, Scarpa A, Inositol trisphosphate-induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle. *Proc Nat Acad Sciences USA* 1985;82:5231-5235.
2. St-Louis J, Massicotte G, Parent A, Effet anti-hypertenseur de la grossesse: influence de la réactivité vasculaire. *Médecine/Science* 1988;4:358-365.
3. Ezimokhai M, Aloamaka CP, Cherian T, Morrison J, The role of extracellular calcium in pregnancy-induced attenuation of phenylephrine contraction in rat aorta with functional endothelium. *J Comp Physiol [B]* 1994;164:81-87.
4. Roy B, Sicotte B, Brochu M, St-Louis J, Modulation of  $Ca^{2+}$  mobilisation in aortic rings of pregnant rats: contribution of extracellular calcium and of voltage-operated calcium channels. *Biol Reprod* 1999;60:979-988.
5. St-Louis J, Pare H, Roy B, Brochu M, Decreased response to vasopressin in the mesenteric resistance arteries of pregnant rats: effects of nifedipine and Bay K 8644. *J Soc Gynecol Invest* 1995;2:516-522.
6. Roy B, Sicotte B, Brochu M, St-Louis J, Effects of nifedipine and Bay K 8644 on myotropic responses in aortic rings of pregnant rats. *Eur J Pharmacol* 1995;280:1-9.
7. Lugnier C, Komasa N, Modulation of vascular cyclic nucleotide phosphodiesterases by cyclic GMP: role in vasodilatation. *Eur Heart J* 1993;14:148
8. Delpy E, Coste H, Gouville AC, Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodiesterase 3. *Br J Pharmacol* 1996;119:471-478.

9. Gris JC, Schved JF, Aguilar-Martinez P, Arnaud A, Sanchez N, Endothelial mediators regulating vascular tonus. *Presse Med* 1991;20:303-308.
10. St-Louis J, Sicotte B, Prostaglandin- or endothelium-mediated vasodilation is not involved in the blunted responses of blood vessels to vasoconstrictors in pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:684-692.
11. Meisheri KD, Hwang O, Van BC, Evidence for two separated Ca<sup>2+</sup> pathways in smooth muscle plasmalemma. *J Membr Biol* 1981;59:19-25.
12. Kishi Y, Numano F, Involvement of cyclic AMP in vasodilatation by amrinone: a comparative study with 3-isobutyl-methyl-xanthine (IBMX). *Jap J Pharmacol* 1986;42:477-485.
13. Stice SL, Ford SP, Rosazza JP, Van OE, Role of 4-hydroxylated estradiol in reducing Ca<sup>2+</sup> uptake of uterine arterial smooth muscle cells through potential-sensitive channels. *Biol Reprod* 1987;36:361-368.
14. Meisheri KD, Palmer RF, Van BC, The effects of amrinone on contractility, Ca<sup>2+</sup> uptake and cAMP in smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1980;61:159-165.
15. Nishimura K, Ota M, Ito K, Existence of two components in the tonic contraction of rat aorta mediated by alpha 1-adrenoceptor activation. *Br J Pharmacol* 1991;102:215-221.
16. Brochu M, Picard S, Jodoin S, St-Louis J, Effects of dihydropyridines on aldosterone secretion in adrenal capsule preparations from pregnant rats. *Am J Physiol* 1997;272:E18-E24
17. Jackson EK, Mi ZC, Carcillo JA, Gillespie DG, Dubey RK, Phosphodiesterases in the rat renal vasculature. *J Cardiovasc.Pharm.* 1997;30:798-801.

18. Nakatsu K, Diamond J, Role of cGMP in relaxation of vascular and other smooth muscle. *Can J Physiol & Pharmacol* 1989;67:251-262. .
19. Mori K, Takeuchi S, Moritoki H, et al, Endothelium-dependent relaxation of rat thoracic aorta by amrinone-induced nitric oxide release. *European Heart Journal* 1996;17:308-316.
20. Fullerton DA, Hahn AR, Banerjee A, Harken AH, Pulmonary vascular smooth muscle relaxation by cGMP- versus cAMP-mediated mechanisms. *J Surgical Res* 1994;57:259-263.
21. Lugnier C, Schoeffter P, Le BA, Strouthou E, Stoclet JC, Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta. *Biochem Pharmacol* 1986;35:1743-1751.
22. Taylor MS, Gao H, Gardner JD, Benoit JN, Effects of IBMX on norepinephrine-induced vasoconstriction in small mesenteric arteries. *Am J Physiol* 1999;39:G909-G914
23. Orlov SN, Tremblay J, Hamet P, cAMP signaling inhibits dihydropyridine-sensitive Ca<sup>2+</sup> influx in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1996;27:774-780.
24. Hurwitz L, Pharmacology of calcium channels and smooth muscle. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology* 1986;26:225-258.

Figure 1. Concentration-response curves to phenylephrine on aortic rings of virgin (A) and pregnant (B) rats in normal KBS (filled symbols) and  $\text{Ca}^{2+}$ -modified KBS (open symbols). The ordinate depicts responses of the aortic ring in g tension, while the abscissa shows the logarithm of the concentration of the stimulant in mol/L. Ten experiments were performed for each response.

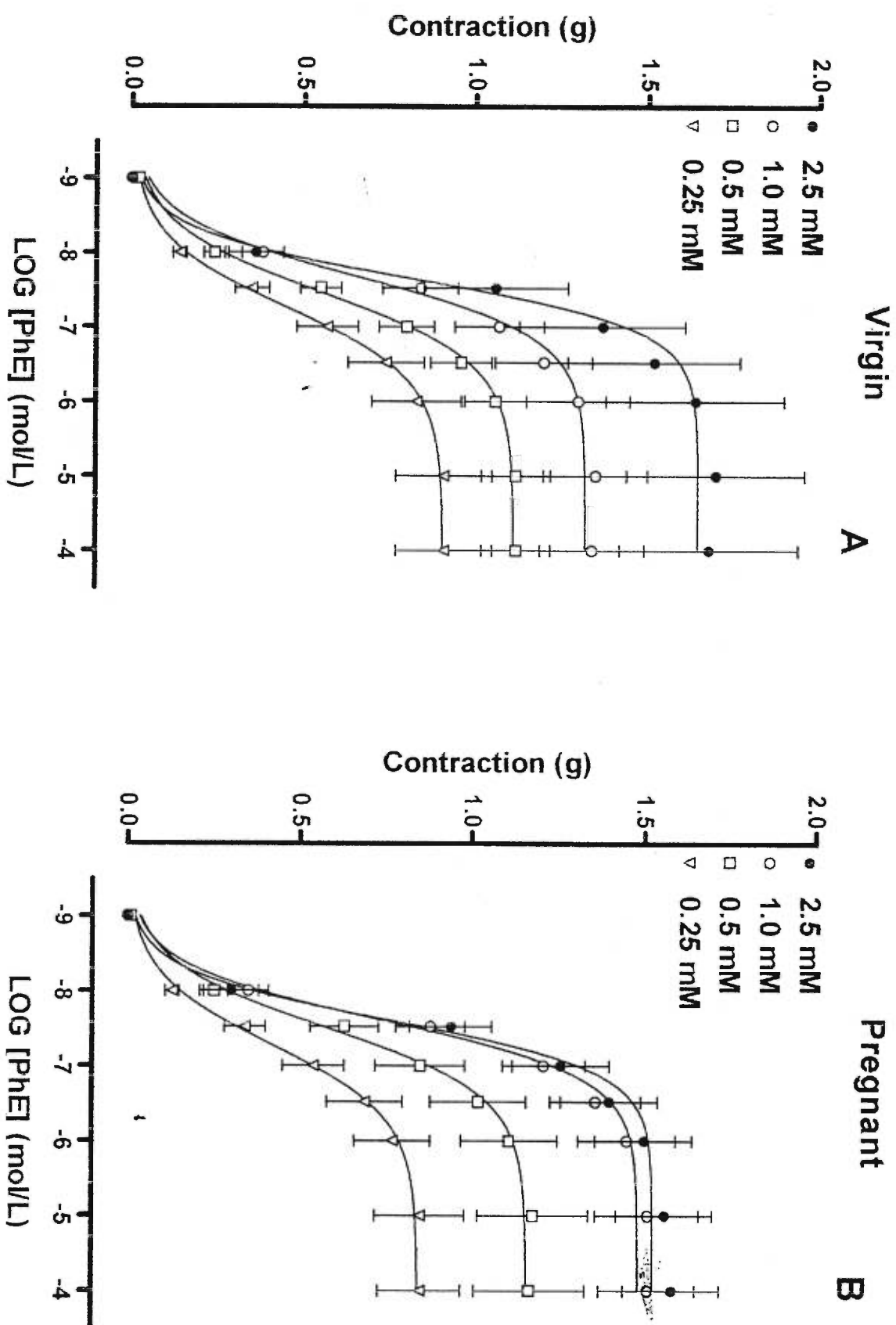
Figure 2. Concentration-response curves to KCl and PhE on aortic rings of virgin (A, C) and pregnant (B, D) rats in the absence (filled symbols) and presence (open symbols) of cinnarizine. The ordinate depicts responses of the aortic ring in g tension, while the abscissa shows the logarithm of the concentration of the stimulant in mol/L. Ten experiments were performed for each response.

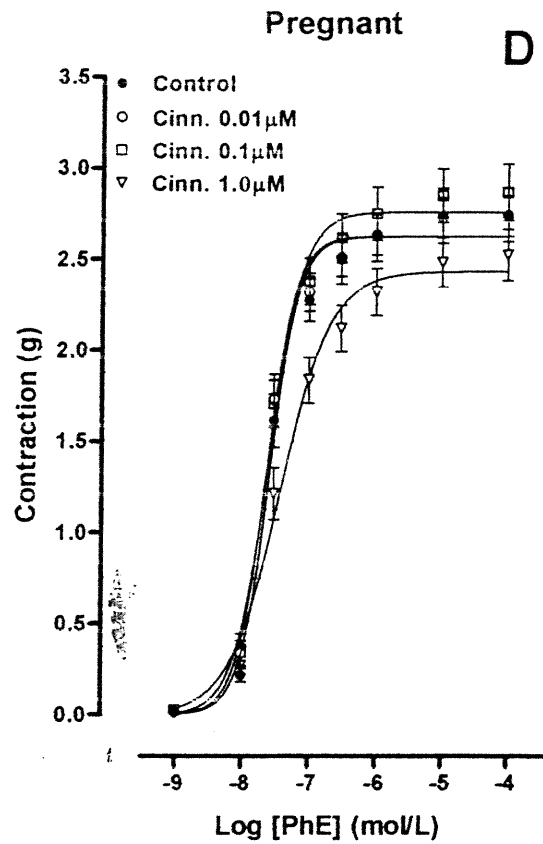
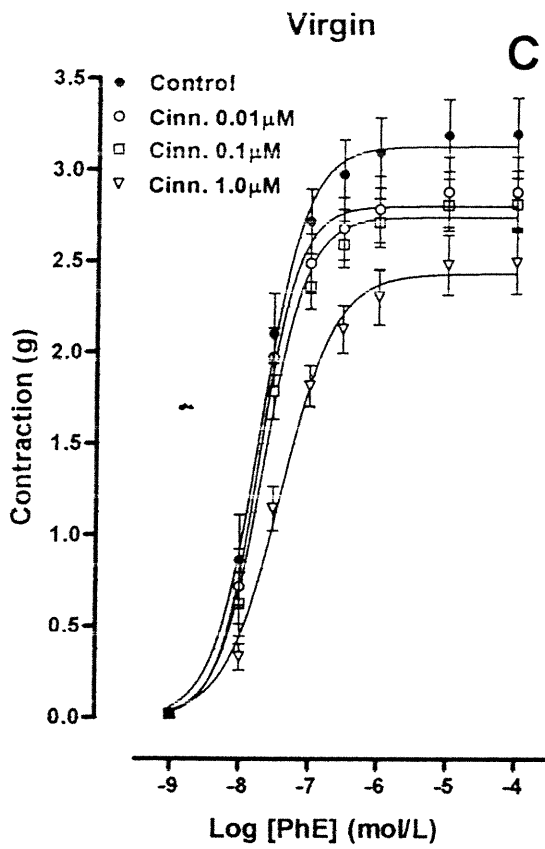
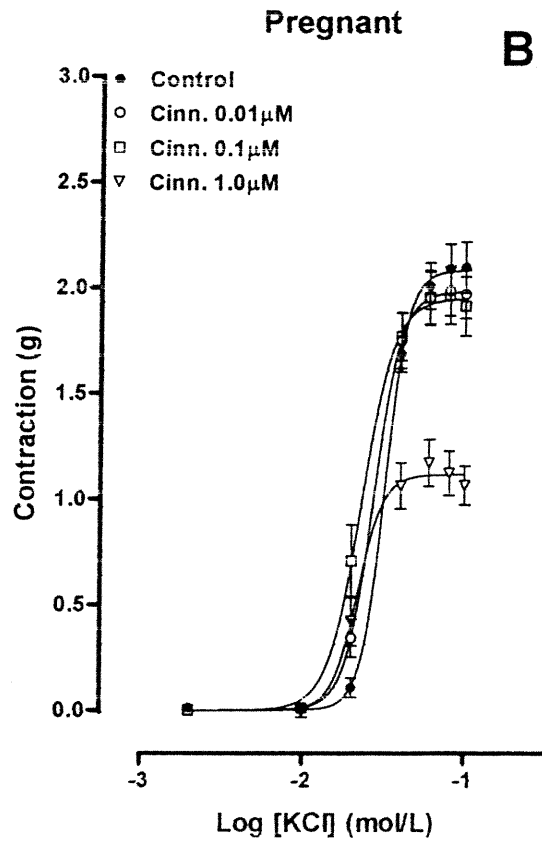
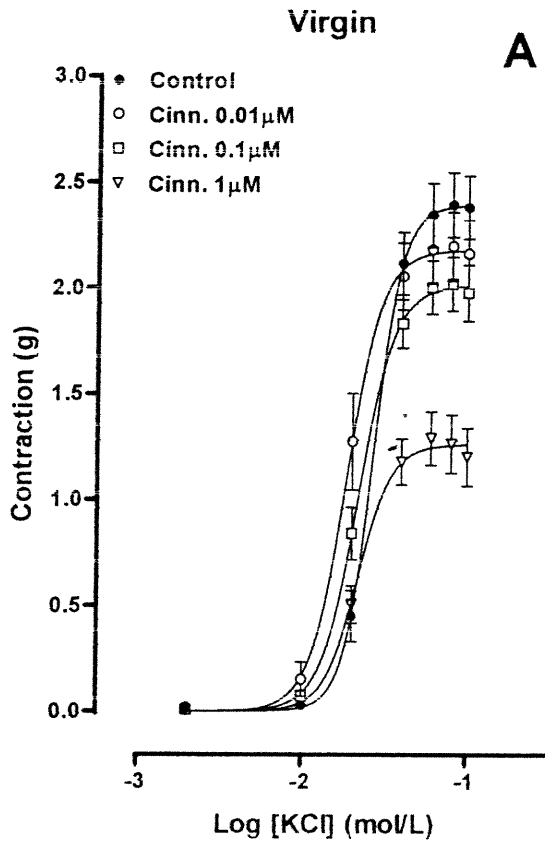
Figure 3. Concentration-response curves to KCl and PhE on aortic rings of virgin (A, C) and pregnant (B, D) rats in the absence (filled symbols) and presence (open symbols) of amrinone. The ordinate depicts responses of the aortic ring in g tension, while the abscissa shows the logarithm of the concentration of the stimulant in mol/L. Ten experiments were performed for each response.

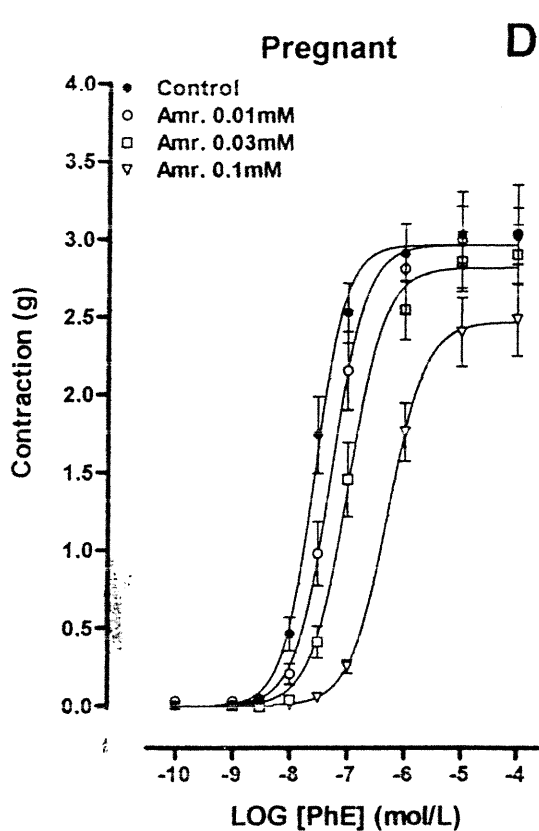
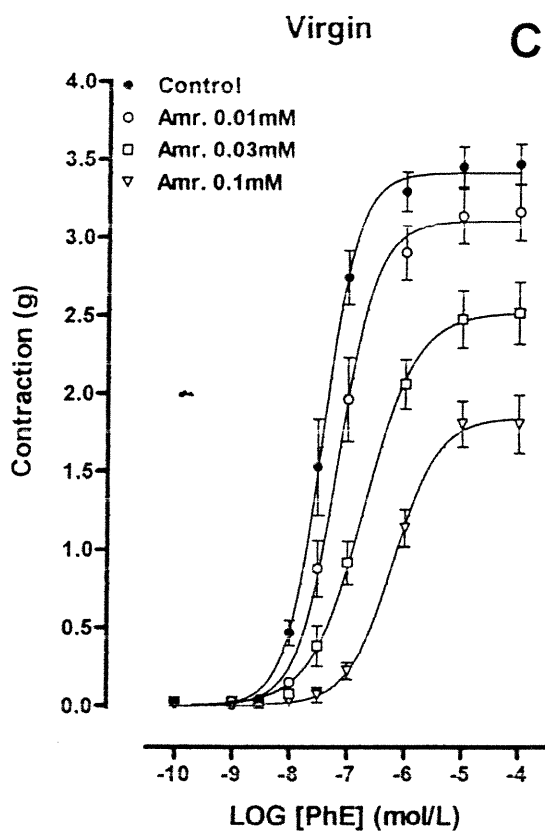
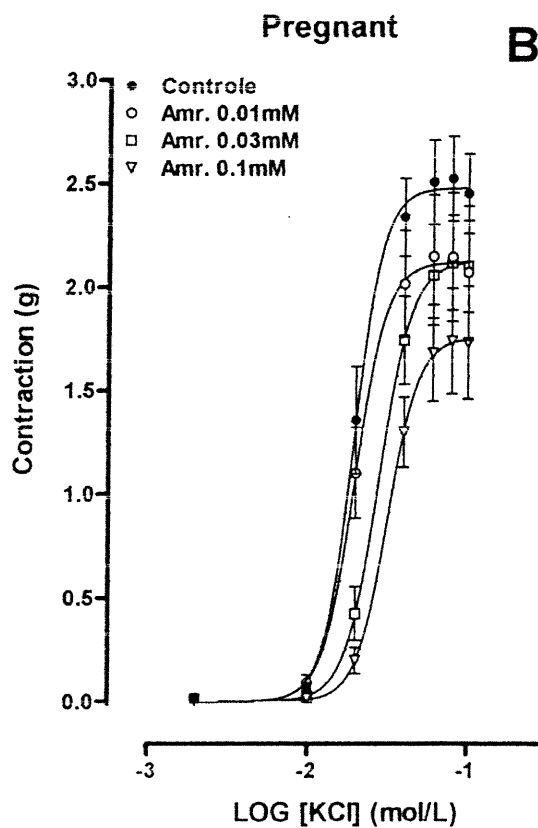
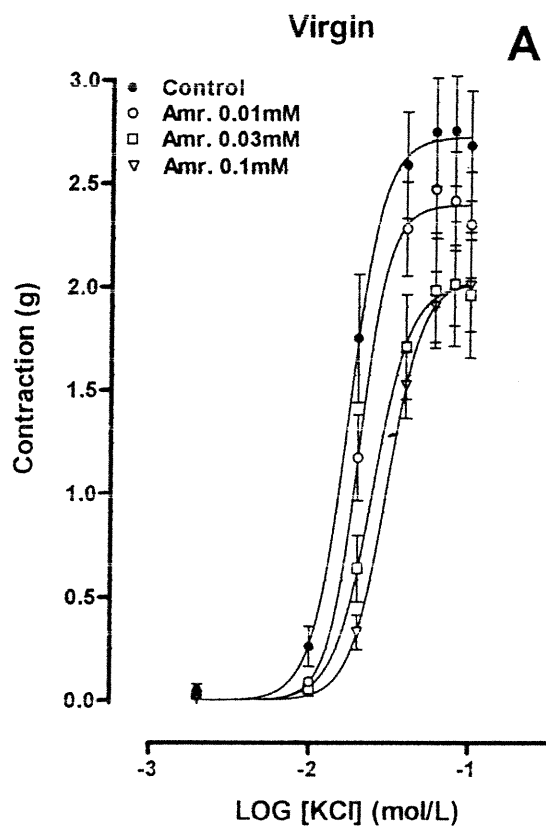
Figure 4. Concentration-response curves to KCl and PhE on aortic rings of virgin (A, C) and pregnant (B, D) rats in the absence (filled symbols) and presence (open symbols) of IBMX. The ordinate depicts responses of the aortic ring in g tension, while the abscissa shows the logarithm of the concentration of the stimulant in mol/L. Ten experiments were performed for each response.

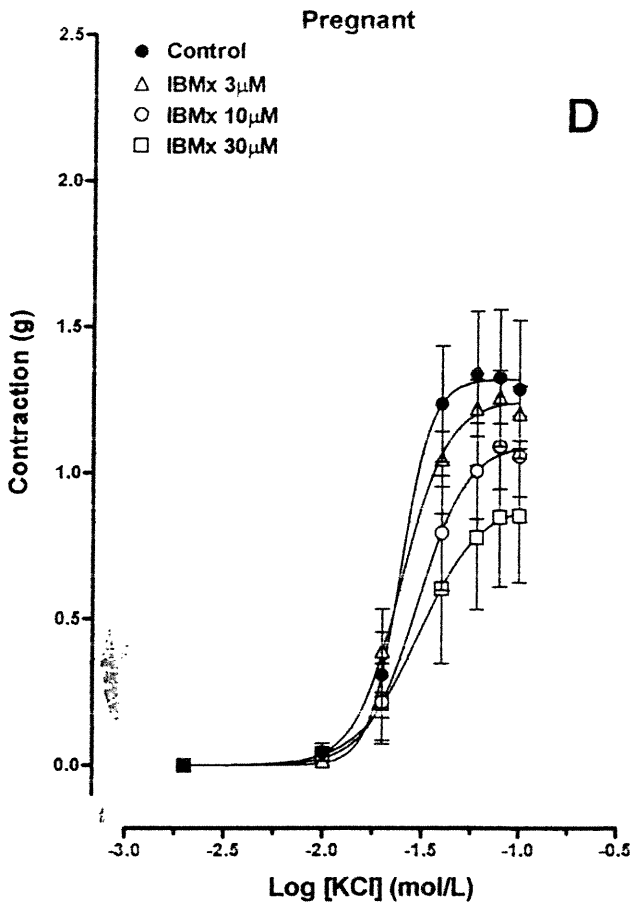
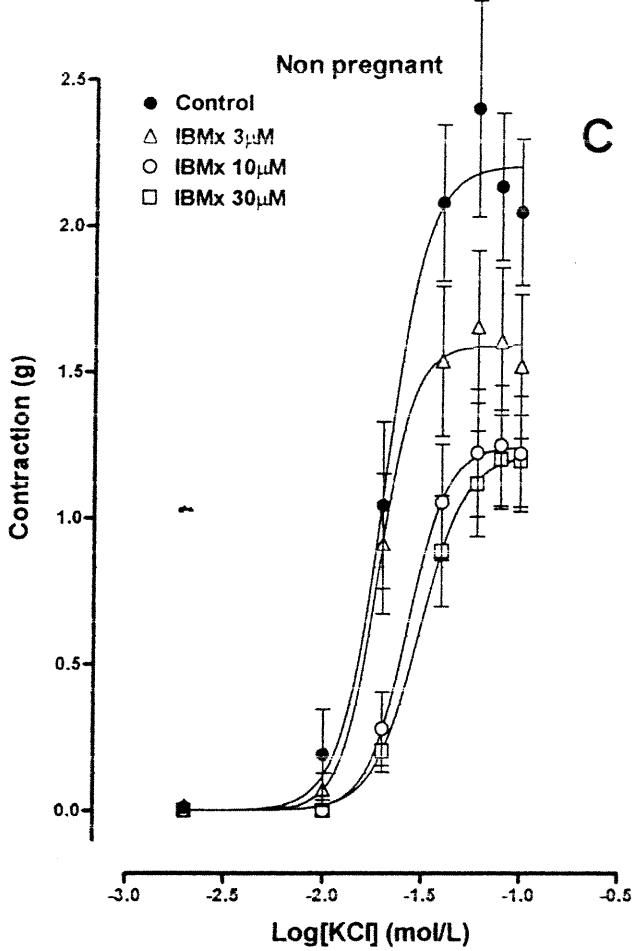
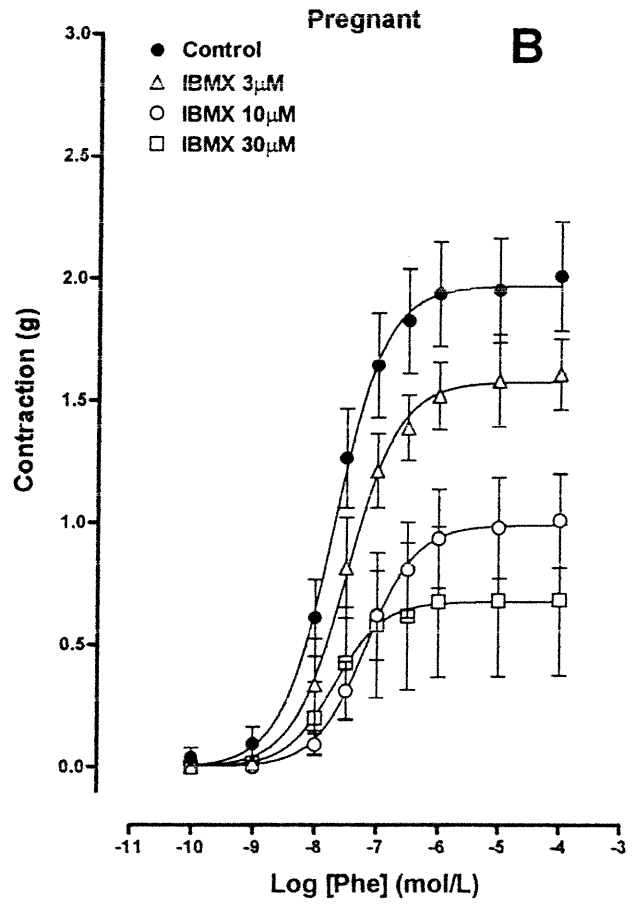
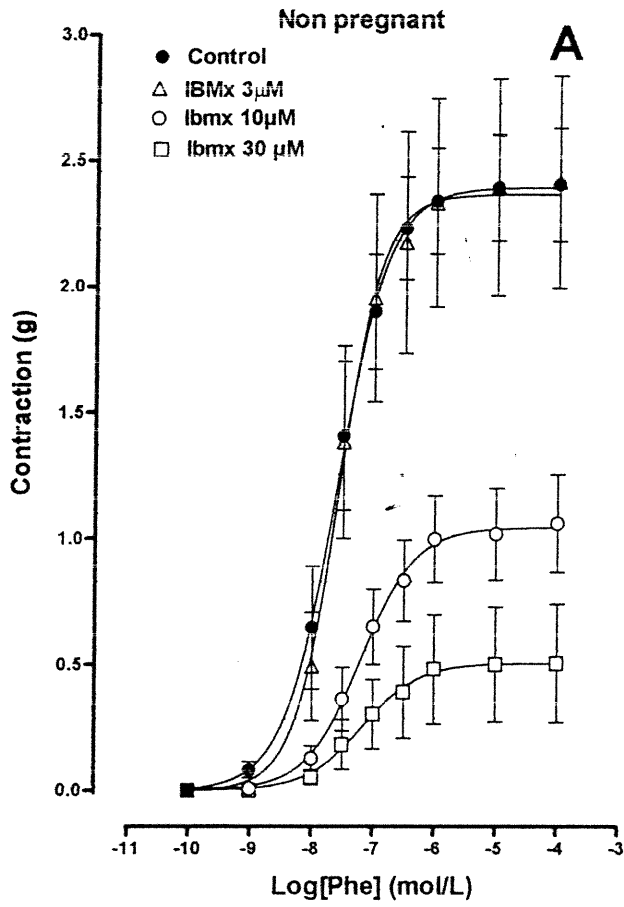
Figure 5. Specific basal and stimulated  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake in aortic rings of virgin and pregnant rats.  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake in aortic rings of virgin (open bars) and pregnant rats (filled bars) in basal condition, upon stimulation with phenylephrine ( $1\text{E-}6$  mol/L), and to phenylephrine with amrinone 0.1 and 0.5 mmol/L. Ten experiments were performed for each response.

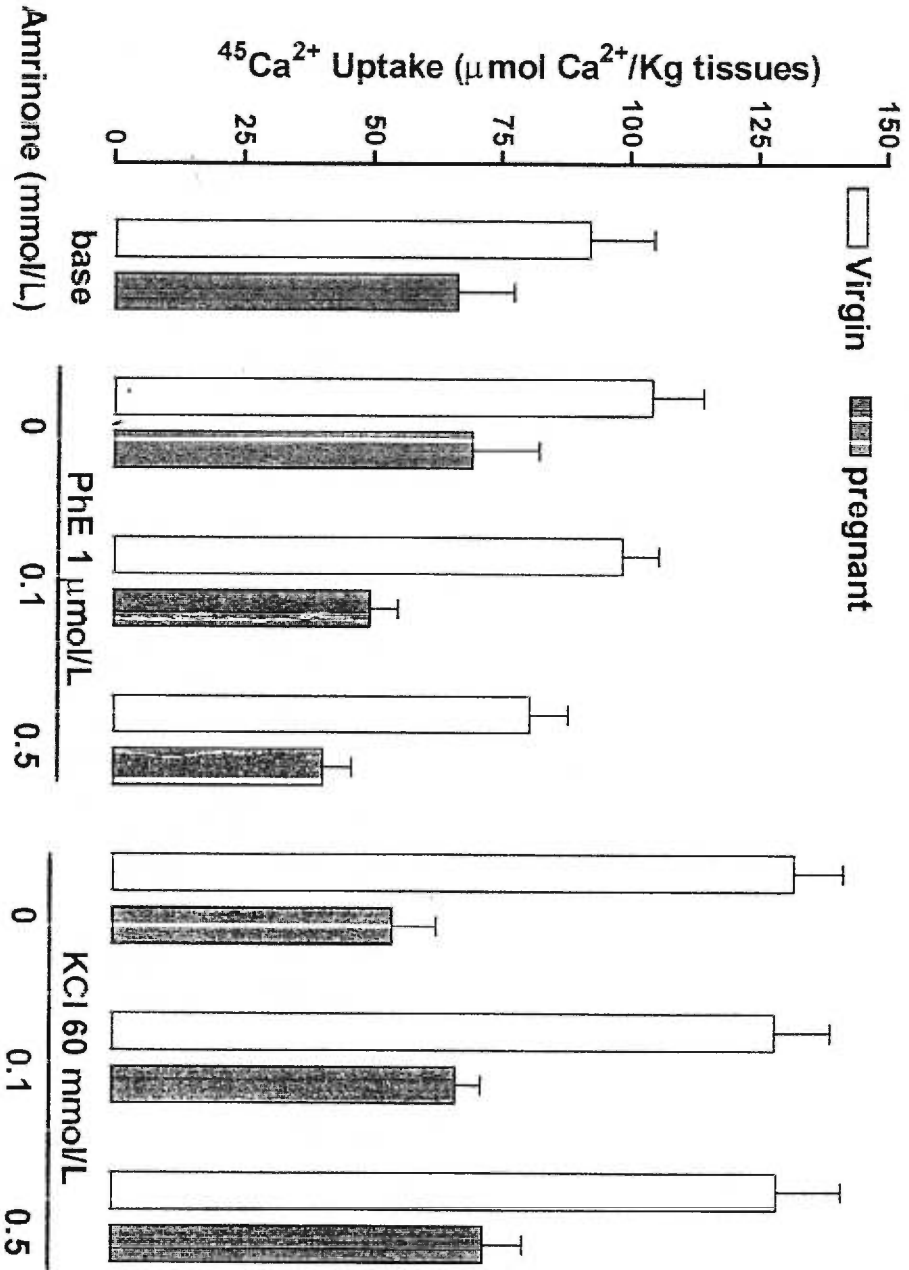












Roy et al., Figure 5

# DISCUSSION

#### 4. Discussion générale

Lors de la grossesse, des diminutions de la pression sanguine et de la réponse pressive aux agents vasoconstricteurs sont observées (pour revue, voir (141)). Les mécanismes qui amènent ces modifications demeurent toutefois peu connus. Chez la rate, notre modèle animal, ces diminutions de réactivité et de pression sanguine surviennent vers la fin de la grossesse (du 19 au 22<sup>e</sup> jour, la parturition se produisant au 23<sup>e</sup> jour) (141). Dans les travaux présentés ici, nous voulions vérifier si des modifications de l'apport de calcium extracellulaire pouvaient, en partie, expliquer ce phénomène.

Nos résultats confirment que la contraction des anneaux aortiques à la phényléphrine est diminuée chez les rates gestantes comparée aux non gestantes. De plus, nous avons observé que les courbes concentration-réponse à la phényléphrine en présence de différentes concentrations de  $\text{CaCl}_2$  dans la solution physiologique montrent que la mobilisation du calcium extracellulaire par les anneaux aortiques de rates gestantes est diminuée en comparaison aux non gestantes. Par contre, en l'absence de calcium extracellulaire, la réponse résiduelle à la phényléphrine est plus grande sur les tissus des gestantes que des vierges; cette différence s'inverse suite au rétablissement de la concentration de calcium extracellulaire. Lorsque préstimulés à la phényléphrine et au chlorure de potassium (KCl), les anneaux aortiques de rates gestantes contractent plus aux concentrations croissantes de calcium que ceux des rates non gestantes. La sensibilité au calcium est identique dans les deux groupes. Cependant, la sensibilité des tissus de rates gestantes au calcium en présence de 80 mmol/L de KCl est augmentée. Ces résultats suggèrent une modification des mécanismes d'entrée de calcium.

Dans un deuxième temps, afin d'étudier la voie d'entrée principale du calcium dans le muscle lisse vasculaire, nous avons utilisé des bloqueurs de canaux calciques dépendants du voltage. Suite à nos travaux précédents avec la nifédipine, nous avons montré que le D-600 et la cinnarizine sont aussi moins efficaces pour diminuer la contraction des anneaux aortiques de rates gestantes que non gestantes. L'amrinone, un agent qualifié de bloqueur de canaux calciques opérés par un récepteur (ROC), est aussi moins efficace à diminuer la contraction sur les tissus de rates gestantes. De plus, la captation du  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  stimulée par le KCl est complètement bloquée par les bloqueurs de canaux calciques dépendants du voltage dans les anneaux aortiques de rats. La captation basale est plus faible dans les aortes de rates gestantes que celles de non gestantes. Lorsqu'on stimule les tissus avec un activateur de canaux calciques, le Bay K 8644, cette différence demeure. L'incorporation de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , avec ou sans stimulation, est retardée dans le temps dans les anneaux aortiques de rates gestantes. Finalement, la liaison d'un ligand tritié, la [ $^3\text{H}$ ]-isradipine sur des anneaux aortiques de rates gestantes est plus faible que sur les tissus des rates vierges.

L'ensemble de ces résultats suggère que la diminution des effets des vasoconstricteurs sur les vaisseaux sanguins de rates gestantes est associée à une réduction, ou à un retard, dans la mobilisation du calcium extracellulaire nécessaire à la contraction. De plus, les canaux calciques dépendants du voltage semblent en partie responsables de cette réduction de mobilisation du calcium par un mécanisme qui se manifeste par une diminution fonctionnelle de leur activité. Plusieurs mécanismes pourraient être évoqués pour expliquer ces effets.



Afin de déterminer l'influence du calcium extracellulaire dans la diminution de la réactivité vasculaire lors de la gestation, nous avons mesuré les effets de bloqueurs de canaux calciques, le D-600, la cinnarizine et l'amrinone, sur les contractions induites par un agent dépolarisant, le KCl, et un agent stimulant les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques, la phényléphrine. Nous observons une diminution de l'inhibition du D-600 sur les réponses à la phényléphrine et au KCl. L'efficacité du D-600 diminue sur les tissus de rates gestantes dans les deux conditions de stimulation, soit à la phényléphrine et au KCl. Les effets du D-600 sur les courbes concentration-réponse au KCl sont similaires à ceux publiés pour la nifédipine (129), ce qui suggère que les deux types de bloqueurs de canaux calciques agissent de façon qualitativement et quantitativement similaire. Par contre, le D-600 est clairement plus efficace que la nifédipine à bloquer les réponses à la phényléphrine. Des études indiquent que le D-600 bloque les contractions à la noradrénaline sur les anneaux aortiques de rats (5;47). Le D-600 est une phénylalkylamine qui se lie à la sous-unité  $\alpha_1$  du canal calcique mais à un site différent de celui de la nifédipine (111). La plus grande efficacité du D-600 sur les anneaux aortiques de rates vierges pourrait être due à cette différence de site de liaison. De plus, cette différence d'efficacité du D-600 lorsque la phényléphrine est utilisée comme agent contractile suggère que ce bloqueur ne serait pas aussi dépendant du voltage que la nifédipine, une dihydropyridine. En effet, Roy et al. (129;130) ont rapporté que d'autres bloqueurs de canaux calciques dépendants du voltage sont plus efficaces lorsque le muscle est dépolarisé à l'aide de KCl que lorsqu'un agoniste  $\alpha_1$ -adrénergique était utilisé. Cet effet plus important du D-600 sur la réponse à la phényléphrine nous a amené à vérifier l'efficacité d'un autre type de bloqueur de canaux

calciques dépendants du voltage, la cinnarizine. La cinnarizine bloque de façon préférentielle l'influx de calcium causé par la noradrénaline, un agoniste des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques (49). En effet, la capacité de la cinnarizine à diminuer la contraction causée par les vasoconstricteurs tels la noradrénaline ou la phényléphrine diffère des autres bloqueurs de canaux calciques (48;49;115). Cet effet de la cinnarizine pourrait être dû à son site de liaison qui, tout comme celui du D-600, est différent de celui des dihydropyridines et des phénylalkylamines (111).

Nous avons observé que le D-600 et la cinnarizine (présente étude) de même que la nifédipine (129) sont moins efficaces à diminuer la réponse contractile des tissus provenant de rates gestantes. Les bloqueurs de canaux calciques se lient aux canaux calciques dépendants du voltage et en bloquent l'influx de calcium provoqué par la dépolarisation et interfèrent avec la contraction (5;119;129). La nifédipine, une dihydropyridine, peut inhiber les contractions induites par le KCl avec plus d'affinité sur l'aorte des rate non gestantes que des rates gestantes (129). De plus, le Bay K 8644, une autre dihydropyridine, mais activatrice des canaux calciques dépendants du voltage, possède aussi une efficacité diminuée à causer une contraction sur les anneaux aortiques de rates gestantes (129). L'ensemble de ces résultats suggèrent une diminution d'efficacité des bloqueurs de canaux calciques dépendants du voltage à inhiber la contraction du muscle lisse vasculaire aux agents vasopresseurs lors de la grossesse chez la rate.

Meisheri et coll. (97) suggèrent que de fortes concentrations d'amrinone abolissent la contraction du muscle lisse vasculaire à la phényléphrine et au KCl. Dans cette étude, l'amrinone, caractérisée en tant qu'inhibiteur de la phosphodiesterase de type

III mais aussi en tant que bloqueur de ROC, est beaucoup plus puissante pour inhiber la contraction maximale à la phényléphrine sur les tissus de rates vierges que gestantes. Bien que les ROC n'aient pas été identifiés par des méthodes biomoléculaires, leur présence est fortement suggérée par des études fonctionnelles. Nous n'observons pas une grande inhibition de la contraction maximale au KCl mais l'amrinone est moins puissante pour inhiber la contraction sur les tissus des rates gestantes. En effet, les tissus provenant de rates gestantes sont moins sensibles à l'amrinone que ceux de rates vierges. Meshieri et al. (97) ont démontré qu'une forte concentration d'amrinone bloquait complètement la contraction à la norépinéphrine et au KCl. Nous n'avons par obtenu un aussi grand effet dans nos expériences. Lugnier et al. (89) rapportent que l'IBMX (500  $\mu\text{mol/L}$ ), un inhibiteur non spécifique de la phosphodiesterase produit une augmentation de sept fois des niveaux d'AMPc et de GMPc dans le muscle lisse vasculaire de rat. L'accumulation d'AMPc inactive la contraction en phosphorylant la phosphatase de la chaîne légère de myosine (myosine light chain phosphatase, MLCP) et en aidant à l'extrusion de calcium (39;97;105). Taylor et al. (150) rapportent aussi que l'IBMX peut diminuer la tension maximale ainsi que la sensibilité à la norépinéphrine dans les artères mésentériques de rats. Leur étude suggère aussi une action de l'IBMX sur le fonctionnement du calcium extra et intracellulaire.

~ Une diminution de l'effet des bloqueurs de canaux calciques de type dihydropyridine sur l'aorte et les artères mésentériques de résistance lors de la gestation est observée (129;142). Ceci pourrait être la conséquence d'une diminution de l'affinité et/ou de la densité des sites de liaison pour les dihydropyridines dans le muscle lisse vasculaire. Suite à nos observations précédentes que la densité et l'affinité de la liaison

de la [ $^3\text{H}$ ]-isradipine ne sont pas modifiées sur des préparations membranaires d'aorte (129) ou de vasculature mésentérique (142) de rates gestantes, nous avons étudié la liaison de la [ $^3\text{H}$ ]-isradipine sur des anneaux aortiques complets. Cette méthode permet d'évaluer l'état fonctionnel des sites de liaison de la [ $^3\text{H}$ ]-isradipine à la surface des cellules musculaires lisses. Nous n'observons pas de différence entre ces deux groupes aux différentes concentrations de KCl étudiées. D'autre part, lors des cinétiques de liaison, soit dans la solution physiologique normale ou dépolarisante (100 mmol/L KCl), la liaison à la [ $^3\text{H}$ ]-isradipine augmente avec le temps. Il faut noter que l'augmentation de la liaison en conditions dépolarisantes est toujours plus élevée sur les anneaux aortiques de rates vierges que gestantes. Dans un autre modèle, Ikeda et coll. (72) démontrent que, sur des tissus de rats spontanément hypertendus (SHR), l'affinité ou la densité des canaux calciques dépendants du voltage ne sont pas différentes de celles des rats normotendus. Ces résultats suggèrent qu'une altération physiologique ou pathologique de la pression sanguine n'impliquerait pas nécessairement une modification de la densité ou de l'affinité des canaux calciques dépendants du voltage du muscle lisse vasculaire. La liaison spécifique de la [ $^3\text{H}$ ]-isradipine a été étudiée sur des anneaux aortiques complets de rats spontanément hypertendus et Wistar-Kyoto sous différentes concentrations de KCl (50). Les résultats de ces études indiquent qu'une proportion de 30% des canaux calciques dépendants du voltage se trouve dans un état de haute affinité pour les dihydropyridines chez les rats hypertendus dans des conditions physiologiques tandis que seulement 5% de ces canaux se trouvent dans cet état chez les Wistar-Kyoto. Nos résultats interprétés à l'aide de ces dernières observations renforcent notre hypothèse

qu'il y aurait une modification de la fonction des canaux calciques dépendants du voltage suite à une modification du potentiel membranaire.

La possibilité d'une modification de la fonction des canaux calciques dépendants du voltage lors de la grossesse nous a amené à étudier l'effet de la modification de la concentration de calcium extracellulaire dans la contraction d'anneaux aortiques de rates gestantes et non gestantes. En l'absence de calcium extracellulaire, nous observons une plus grande réponse contractile à la phényléphrine des anneaux aortiques de rates gestantes comparé aux non gestantes (Figure 1 et 2, article #1). Cette contraction résiduelle est probablement due à la relâche de calcium intracellulaire, puisqu'observée en présence d'EGTA (Figure 2, Art. #1). L'augmentation de cette réponse résiduelle chez les gestantes pourrait être due à une plus grande quantité de calcium dans les pools intracellulaires du muscle lisse vasculaire, à une relâche facilitée de ce calcium ou à une inhibition des mécanismes de séquestration dans les réservoirs intracellulaires de calcium. La contraction du muscle lisse vasculaire induite par l'activation d'un récepteur  $\alpha_1$ -adrénergique est causée par la relâche de calcium des pools intracellulaires et par l'entrée du calcium extracellulaire par les canaux calciques (117). De même, elle peut être séparée expérimentalement en deux composantes: contraction phasique et contraction tonique, la première dépendante du calcium intracellulaire alors que la seconde serait sous l'influence du calcium extracellulaire (117). Par contre, Ezimokhai et al. (34) rapportent que les effets de la phényléphrine, en l'absence de calcium extracellulaire (+ EGTA), sont similaires dans les anneaux aortiques de rates non gestantes et gestantes. Cependant, leur protocole ne semble pas permettre le remplissage complet des calciosomes avant de tester leurs anneaux à la phényléphrine.

Des courbes concentration-réponse à la phényléphrine ont été construites en présence de différentes concentrations de calcium extracellulaire. Comme le montre ces courbes, les anneaux aortiques de rates non gestantes sont plus affectés par la diminution du calcium extracellulaire que les tissus de rates gestantes. En effet, la diminution de la concentration extracellulaire de calcium de 2.5 mmol/L à 1.0 mmol/L réduit la contraction maximale des tissus de rates non gestantes. Sur les aortes de rates gestantes, en présence de ces deux concentrations de calcium extracellulaire, les réponses à la phényléphrine sont identiques quoique diminuées en comparaison aux rates non gestantes. Si on diminue encore plus le calcium extracellulaire, la réponse à la phényléphrine sur les anneaux aortiques de rates gestantes est beaucoup moins atténuée que celle des rates non gestantes. Ezimokhai et coll. (34) rapportent des résultats semblables aux nôtres. En effet, la contraction du muscle lisse vasculaire aortique induite par la phényléphrine est diminuée de façon plus importante en présence de 0.8 mmol/L de calcium sur les tissus de rates vierges que gestantes. De plus, l'endothélium vasculaire ne semble pas jouer de rôle dans ces diminutions différentes de réponse puisque, par opposition aux nôtres, leurs expériences (34) sont faites en présence de cette structure. Ces résultats suggèrent une modification de la mobilisation du calcium et/ou une altération des mécanismes utilisant le calcium dans la contraction du muscle lisse vasculaire. Afin de vérifier plus directement l'utilisation du calcium par le muscle lisse vasculaire, nous avons étudié l'incorporation du  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ .

La contraction vasculaire peut être séparée expérimentalement en deux composantes: contraction phasique et contraction tonique, la première serait dépendante du calcium intracellulaire alors que la seconde serait sous l'influence du calcium

extracellulaire (117). L'influx de calcium de l'extérieur de la cellule est nécessaire pour l'expression de la composante tonique de la contraction du muscle lisse vasculaire (34;117). Tel que discuté plus haut, des anneaux aortiques de rates gestantes baignant dans des solutions physiologiques contenant des concentrations réduites de calcium extracellulaire (de 0.8 mmol/L à 1.6 mmol/L) sont moins affectés quant à leur réponse à la phényléphrine par la diminution du calcium extracellulaire que ceux des rates non gestantes (34).

Nous observons une inhibition totale de l'influx de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  induite par le KCl à l'aide d'une variété de bloqueurs de canaux calciques. Ces résultats indiquent que la captation de calcium causée par le KCl est bien induite par les canaux calciques dépendants du voltage. De façon constante, la captation de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  par les anneaux aortiques de rates gestantes est moins élevée que dans les tissus de rates non gestantes. De plus, suite à une stimulation à l'aide de concentration égale de KCl, cette différence est maintenue dans les deux groupes. L'utilisation d'un activateur des canaux calciques dépendants du voltage n'est pas parvenu à réduire ou abolir cette différence. La diminution de cette captation observée pendant la grossesse suggère fortement une altération d'une voie majeure d'influx de calcium: le canal calcique de type L.

Les bloqueurs de canaux calciques dépendants du voltage n'agissent pas en bloquant physiquement le canal mais en y changeant la probabilité d'ouverture, qui est augmenté par les activateurs (tel le Bay K 8644) et diminué par les bloqueurs (tels la nifédipine, le D-600, la cinnarizine, etc.) (126). Des études électrophysiologiques montrent aussi que le bloc des canaux calciques dépendants du voltage par les bloqueurs de canaux calciques peut être augmenté en diminuant le potentiel de maintien (*holding*

*potential*) des cellules lisses vasculaires (104). Ces canaux existent dans trois conformations: fermés, activés et inactivés (69). Le temps qu'un canal passe dans un état donné est déterminé par le potentiel membranaire. Le temps qu'un canal passe dans la conformation ouverte augmente exponentiellement avec la dépolarisation membranaire (114). Nous avons observé que le Bay K 8644 induit un effet contractile direct sur les anneaux aortiques de rates vierges mais pas sur ceux de rates gestantes (129). Cet effet du Bay K 8644 peut être contrôlé par le KCl. Le KCl agit en modifiant le potentiel membranaire et, par conséquent, la conformation des canaux calciques dépendants du voltage. Le rétablissement de l'effet du Bay K 8644 par le KCl dans les anneaux aortiques de rates gestantes pourrait résulter de cette modification de potentiel membranaire (47;111;117;129). Ces données suggèrent fortement que l'absence d'effet direct du Bay K 8644 sur les anneaux aortiques de rates gestantes serait dû à une augmentation du potentiel membranaire.

Des études antérieures effectuées dans notre laboratoire montrent qu'il est possible de rétablir sur les aortes de rates gestantes l'effet du Bay K 8644 similaire à celui de rates non gestantes en utilisant de faibles concentrations de KCl, différentes chez les deux groupes d'aortes (129). Ces concentrations de KCl semblent agir sur la membrane et rétablir le potentiel membranaire des cellules musculaires lisses vasculaires des anneaux aortiques de rates gestantes au niveau des rates non gestantes. Cadorette *et al.* (17b) démontrent que bloquer les canaux potassiques à l'aide du TEA (un bloqueur non spécifique de canaux potassiques) produit le même type d'observation que Roy *et al.* (130). Lorsque le muscle lisse vasculaire de l'aorte de rates est légèrement dépolarisé, la différence d'effet du Bay K 8644 en comparaison aux tissus de rates non



gestantes disparaît. Cadorette *et al.* (17b) ont aussi observé une diminution de la capacité de TEA à provoquer la contraction des anneaux aortiques de rates gestantes. Les tissus provenant de rates non gestantes répondaient au TEA. Ceci supporte la possibilité qu'une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses vasculaires, en partie, pourrait être la cause de la diminution de la réactivité vasculaire lors de la gestation chez la rate. En effet, Meyer et coll. (99) rapportent que lors de la grossesse, une hyperpolarisation (environ 7 mV) des cellulaires musculaires lisses vasculaires survient dans les vaisseaux mésentériques de résistance. On sait qu'une hyperpolarisation de 2 mV peut diminuer la probabilité d'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage d'environ 30% (114). Cette diminution de probabilité signifie qu'une plus grande proportion des canaux calciques dépendants du voltage est dans la conformation fermée, déplaçant l'équilibre des canaux vers cette forme. La conformation des canaux calciques dépendants du voltage pour laquelle les bloqueurs démontrent la meilleure affinité est la conformation inactivée (47). Ainsi, les bloqueurs de canaux calciques dépendants du voltage se lient avec une affinité diminuée à cette conformation, ce qui pourrait expliquer la diminution de leur capacité à inhiber la contraction.

Un aspect important de la contraction vasculaire est la contraction initiale, phasique, causée par la relâche de calcium des calciosomes. Tel qu'expliqué plus haut, cette contraction ne dépend que d'une relâche de calcium intracellulaire. Nous avons observé que cette contraction est plus importante dans les anneaux aortiques de rates gestantes. Ces résultats suggèrent une relâche accrue de calcium intracellulaire. Le protocole utilisé pour la présente série d'expériences visait à vider les compartiments sensibles à la phényléphrine, les calciosomes situés dans le sarcoplasme. Nous avons

observé qu'aucune contraction ne survient suite à ce protocole en l'absence de calcium extracellulaire. À tous les temps étudiés, la captation du  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  est retardée dans les anneaux aortiques de rates gestantes en comparaison aux rates vierges. L'hyperpolarisation suggérée par nos résultats pourrait expliquer ce retard, puisque si les canaux calciques dépendants du voltage ont moins de probabilité d'ouverture, ils conduiront le calcium vers l'intérieur de la cellule avec un certain délais. Cette avenue demeure peu explorée.

Nous avons observé une action plus grande de l'amrinone à bloquer la captation de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  sur les anneaux aortiques de rates gestantes que vierges. Cette action pourrait être dû à son action sur les PDEs qui, indirectement, pourrait augmenter l'extrusion du calcium. L'amrinone inhibe la PDE III (80), tandis que l'IBMX est un inhibiteur non sélectif des phosphodiésterases (73;80). La contraction causée par un agoniste  $\alpha_1$ -adrénergique implique plusieurs messagers intracellulaires. On connaît bien les mécanismes par lesquels l'activation du récepteur cause l'activation de la phospholipase C (PLC) qui hydrolyse le phosphatidyl inositol biphosphate ( $\text{PIP}_2$ ) en diacylglycérol (DAG) et en inositol 1,4,5-triphosphate ( $\text{IP}_3$ ). L' $\text{IP}_3$  provoque la relâche de calcium des compartiments intracellulaires ce qui initie la contraction du muscle lisse vasculaire. Afin de contrecarrer cette contraction et de ramener le muscle lisse à son état de repos, une cascade d'événement intracellulaires s'initie. Entre autre, une augmentation des nucléotides cycliques (AMPc et GMPc) se produit (pour revue, voir (110)). L'AMPc inactive, entre autre, la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK) et est dégradé par la PDE. En inhibant cette enzyme par l'IBMX ou l'amrinone, l'AMPc s'accumule dans le muscle lisse vasculaire et inactive la contraction en

inactivant la MLCK. L'AMPc stimule aussi les pompes à calcium à la surface des cellules musculaires lisses favorisant l'extrusion du calcium intracellulaire (39;97;105).

Comme nous le voyons dans nos études en bains à organe isolé, l'amrinone possède un effet inhibiteur sur les deux groupes de tissus étudiés mais est plus puissant sur les anneaux aortiques de rates non gestantes tandis que le contraire est observé lors d'études de captation de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . La première partie de cette observation pourrait s'expliquer par l'action de l'amrinone sur les ROCs comme il a été suggéré (96;97;145). Une partie du calcium nécessaire à la contraction du muscle lisse provient du milieu extracellulaire. Stice et coll. (145) rapportent que l'amrinone peut bloquer de façon dépendante de la concentration la captation de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  provoqué par la phényléphrine. Cet effet bloqueur est plus élevé sur les tissus de rates non gestantes. Une étude de Meisheri et coll. (97) rapporte que lorsque l'amrinone est ajoutée la captation de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , diminue lorsque les tissus sont stimulés à la noradrénaline alors qu'aucun effet n'est observé lorsque le KCl est utilisé.

Nos travaux démontrent clairement une diminution de l'activité des agents vasoconstricteurs sur les anneaux aortiques isolés de rates gestantes comparée aux rates non gestantes. Cette modification de la réponse contractile pourrait être attribuée à une diminution de la sensibilité des bloqueurs de canaux calciques dépendants du voltage et à une diminution de la mobilisation du calcium extracellulaire dans le muscle lisse vasculaire, puisque nous n'avons pu démontrer une diminution de la liaison d'un bloqueur de canaux calciques sur des anneaux aortiques complets lors de la gestation. L'action de l'activateur des canaux calciques dépendants du voltage, le Bay K

8644, peut être contrôlée par le KCl ce qui suggère une modification du potentiel de membrane pendant la grossesse. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de la phosphodiesterase suggère que les mécanismes servant à rétablir le tonus de base des vaisseaux sanguins pourraient être accentués lors de la grossesse chez la rate. Les mécanismes amenant ces modifications restent à être élucidés.

## 5. Références

1. Anggard E, Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 1994;343:1199-1206.
2. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F, Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977;74:3203-3207.
3. Atarashi K, Mulrow PJ, Franco-Saenz R, Snajdar R, Rapp J, Inhibition of aldosterone production by an atrial extract. *Science* 1984;224:992-994.
4. Bean BP, Nitrendipine block of cardiac calcium channels: high-affinity binding to the inactivated state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984;81:6388-6392.
5. Beckeringh JJ, Thoolen MJ, de JA, Wilffert B, Timmermans PB, van Zwieten PA, Differential effects of the calcium entry blocker D 600 on contractions of rat and guinea-pig aortas, elicited by various alpha-1 adrenoceptor agonists. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1984;229:515-521.
6. Beldekas JC, Smith B, Gerstenfeld LC, Sonenshein GE, Franzblau C, Effects of 17 beta-estradiol on the biosynthesis of collagen in cultured bovine aortic smooth muscle cells. *Biochemistry* 1981;20:2162-2167.
7. Benigni A, Gaspari F, Orisio S, et al, Human placenta expresses endothelin gene and corresponding protein is excreted in urine in increasing amounts during

- normal pregnancy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1991;164:844-848.
8. Bertolino M, Llinas RR, The central role of voltage-activated and receptor-operated calcium channels in neuronal cells. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology* 1992;32:399-421.
  9. Biel M, Ruth P, Bosse E, et al, Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung. *FEBS Letters* 1990;269:409-412.
  10. Boles RG, Yamamura HI, Schoemaker H, Roeske WR, Temperature-dependent modulation of [3H]nitrendipine binding by the calcium channel antagonists verapamil and diltiazem in rat brain synaptosomes. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 1984;229:333-339.
  11. Bond M, Somlyo AV, Dense bodies and actin polarity in vertebrate smooth muscle. *Journal of Cell Biology* 1982;95:403-413.
  12. Bosse E, Regulla S, Biel M, et al, The cDNA and deduced amino acid sequence of the gamma subunit of the L-type calcium channel from rabbit skeletal muscle. *FEBS Letters* 1990;267:153-156.
  13. Brayden JE, Nelson MT, Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science* 1992;256:532-535.

14. Brayden JE, Wellman GC, Endothelium-dependent dilation of feline cerebral arteries: role of membrane potential and cyclic nucleotides. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 1989;9:256-263.
15. Brown GP, Venuto RC, Angiotensin II receptor alterations during pregnancy in rabbits. *American Journal of Physiology* 1986;251:E58-E64
16. Bryant-Greenwood GD, Relaxin as a new hormone. *Endocrine Reviews* 1982;3:62-90.
17. Burnett JC, Jr., Granger JP, Opgenorth TJ, Effects of synthetic atrial natriuretic factor on renal function and renin release. *American Journal of Physiology* 1984;247:F863-F866
- 17a. Burnstock G, Ralevic V, New insights into the local regulation of blood flow by perivasculare nerves and endothelium. *British Journal of Plastic Surgery* 1994;47 :527-543
- 17b. Cadorette C, Sicotte B, Brochu M, St-Louis J, Effects of potassium channel modulators on myotropic responses of aortic rings of pregnant rats. *American Journal of Physiology* 2000;278 :H567-H576.
18. Capeless EL, Clapp JF, Cardiovascular changes in early phase of pregnancy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1989;161:1449-1453.
19. Carlson EC, Burrows ME, Johnson PC, Electron microscopic studies of cat mesenteric arterioles: a structure-function analysis. *Microvascular Research* 1982;24:123-141.

20. Castellano A, Wei X, Birnbaumer L, Perez-Reyes E, Cloning and expression of a neuronal calcium channel beta subunit. *Journal of Biological Chemistry* 1993;268:12359-12366.
21. Catterall WA, Seagar MJ, Takahashi M, Molecular properties of dihydropyridine-sensitive calcium channels in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry* 1988;263:3535-3538.
22. Cauvin C, Lukeman S, Cameron J, Hwang O, van Breemen C, Differences in norepinephrine activation and diltiazem inhibition of calcium channels in isolated rabbit aorta and mesenteric resistance vessels. *Circulation Research* 1985;56:822-828.
23. Chang WC, Nakao J, Orimo H, Murota SI, Stimulation of prostaglandin cyclooxygenase and prostacyclin synthetase activities by estradiol in rat aortic smooth muscle cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1980;620:472-482.
24. Chesley LC, *Hypertensive Disorders in Pregnancy*. Appleton-Century-Crofts, New York 1978;236.
25. Cook NS, The pharmacology of potassium channels and their therapeutic potential. *Trends in Pharmacological Sciences* 1988;9:21-28.
26. Crandall ME, Keve TM, McLaughlin MK, Characterization of norepinephrine sensitivity in the maternal splanchnic circulation during pregnancy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1990;162:1296-1301.



27. Danforth DN, Manalo-Estrella P, Buckingham JC, The effect of pregnancy and of Enovid on the rabbit vasculature. *American Journal of Obstetric & Gynecology* 1964;88:952-962.
28. Davidge ST, McLaughlin MK, Endogenous modulation of the blunted adrenergic response in resistance-sized mesenteric arteries from the pregnant rat. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1992;167:1691-1698.
29. De Jongh KS, Warner C, Colvin AA, Catterall WA, Characterization of the two size forms of the alpha 1 subunit of skeletal muscle L-type calcium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991;88:10778-10782.
30. Dubel SJ, Starr TV, Hell J, et al, Molecular cloning of the alpha-1 subunit of an omega-conotoxin- sensitive calcium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89:5058-5062.
31. Eckert R, Chad JE, Inactivation of Ca channels. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 1984;44:215-267.
32. Ellis SB, Williams ME, Ways NR, et al, Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha 1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *Science* 1988;241:1661-1664.
33. Erkkola R, Tabsh K, Ushioda E, Nuwayhid B, Brinkman CR3, Assali NS, Responses of the pelvic vascular bed to intra-arterial stimulation of beta-adrenergic and cholinergic receptors in pregnant and nonpregnant sheep. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1981;141:599-607.

34. Ezimokhai M, Aloamaka CP, Cherian T, Morrison J, The role of extracellular calcium in pregnancy-induced attenuation of phenylephrine contraction in rat aorta with functional endothelium. *Journal of Comparative Physiology B:Biochemical, Systemic and Environmental Physiology* 1994;164:81-87:X.
35. Ferry DR, Goll A, Gadow C, Glossmann H, (-)-3H-desmethoxyverapamil labelling of putative calcium channels in brain: autoradiographic distribution and allosteric coupling to 1,4-dihydropyridine and diltiazem binding sites. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 1984;327:183-187.
36. Fosset M, Jaimovich E, Delpont E, Lazdunski M, [3H]nitrendipine receptors in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry* 1983;258:6086-6092.
37. Fox AP, Nowycky MC, Tsien RW, Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *Journal of Physiology* 1987a;394:149-172.
38. Fox AP, Nowycky MC, Tsien RW, Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. *Journal of Physiology* 1987b;394:173-200.
39. Fullerton DA, Hahn AR, Banerjee A, Harken AH, Pulmonary vascular smooth muscle relaxation by cGMP- versus cAMP-mediated mechanisms. *Journal of Surgical Research* 1994;57:259-263.
40. Galizzi JP, Fosset M, Lazdunski M, [3H]verapamil binding sites in skeletal muscle transverse tubule membranes. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 1984a;118:239-245.

41. Galizzi JP, Fosset M, Lazdunski M, Properties of receptors for the Ca<sup>2+</sup>-channel blocker verapamil in transverse-tubule membranes of skeletal muscle. Stereospecificity, effect of Ca<sup>2+</sup> and other inorganic cations, evidence for two categories of sites and effect of nucleoside triphosphates. *European Journal of Biochemistry* 1984b;144:211-215.
42. Galizzi JP, Fosset M, Lazdunski M, Characterization of the Ca<sup>2+</sup> coordination site regulating binding of Ca<sup>2+</sup> channel inhibitors d-cis-diltiazem, (+/-)bepridil and (-)desmethoxyverapamil to their receptor site in skeletal muscle transverse tubule membranes. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 1985;132:49-55.
43. Gant NF, Chand S, Worley RJ, Anderson GD, Unpublished observations 1977.
44. Glossmann H, Ferry DR, Goll A, Striessnig J, Zernig G, Calcium channels and calcium channel drugs: recent biochemical and biophysical findings. *Arzneimittel-Forschung* 1985;35:1917-1935.
45. Glossmann H, Linn T, Rombusch M, Ferry DR, Temperature-dependent regulation of d-cis-[<sup>3</sup>H]diltiazem binding to Ca<sup>2+</sup> channels by 1,4-dihydropyridine channel agonists and antagonists. *FEBS Letters* 1983;160:226-232.
46. Glossmann H, Striessnig J, Calcium channels. *Vitamins & Hormones* 1988;44:155-328.
47. Godfraind T, Analysis of factors involved in the tissue selectivity of calcium antagonists. *Advances in Experimental Medicine & Biology* 1992;311:103-122.

48. Godfraind T, Miller RC, Specificity of action of Ca<sup>++</sup> entry blockers. A comparison of their actions in rat arteries and in human coronary arteries. *Circulation Research* 1983;52:181-191.
49. Godfraind T, Miller RC, Lima JS, Selective alpha 1- and alpha 2-adrenoceptor agonist-induced contractions and <sup>45</sup>Ca fluxes in the rat isolated aorta. *British Journal of Pharmacology* 1982;77:597-604.
50. Godfraind T, Morel N, Wibo M, Modulation of the action of calcium antagonists in arteries. *Blood Vessels* 1990;27:184-196.
51. Goll A, Ferry DR, Glossmann H, Target size analysis and molecular properties of Ca<sup>2+</sup> channels labelled with [<sup>3</sup>H]verapamil. *European Journal of Biochemistry* 1984;141:177-186.
52. Gris JC, Schved JF, Aguilar-Martinez P, Arnaud A, Sanchez N, Endothelial mediators regulating vascular tonus. *Presse Medicale* 1991;20:303-308.
53. Guy HR, Conti F, Pursuing the structure and function of voltage-gated channels. *Trends in Neurosciences* 1990;13:201-206.
54. Hai CM, Murphy RA, Regulation of shortening velocity by cross-bridge phosphorylation in smooth muscle. *American Journal of Physiology* 1988;255:C86-C94
55. Harder DR, Pressure-dependent membrane depolarization in cat middle cerebral artery. *Circulation Research* 1984;55:197-202.

56. Harder DR, Gilbert R, Lombard JH, Vascular muscle cell depolarization and activation in renal arteries on elevation of transmural pressure. *American Journal of Physiology* 1987;253:F778-F781
57. Harder DR, Kauser K, Roman RJ, Lombard JH, Mechanisms of pressure-induced myogenic activation of cerebral and renal arteries: role of the endothelium. *Journal of Hypertension - Supplement* 1989;7:S11-S15
58. Hart MV, Morton MJ, Hosenpud JD, Metcalfe J, Aortic function during normal human pregnancy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1986;154:887-891.
59. Hathaway DR, March KL, Lash JA, Adam LP, Wilensky RL, Vascular smooth muscle. A review of the molecular basis of contractility. *Circulation* 1991;83:382-390.
60. Heinemann SH, Terlau H, Stuhmer W, Imoto K, Numa S, Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 1992;356:441-443.
61. Hille B, *Ionic Channels of Excitable Cells*. , 1984a;117-147:-147
62. Hille B, *Ionic Channels of Excitable Membranes*. , 1984b;205-225:-225
63. Hillman D, Chen S, Aung FT, Cherksey B, Sugimori M, Llinas RR, Localization of P-type calcium channels in the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991;88:7076-7080.

64. Hirning LD, Fox AP, McCleskey EW, et al, Dominant role of N-type Ca<sup>2+</sup> channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science* 1988;239:57-61.
65. Hirst GD, Neuromuscular transmission in arterioles of guinea-pig submucosa. *Journal of Physiology* 1977;273:263-275.
66. Hirst GD, Edwards FR, Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. *Physiological Reviews* 1989;69:546-604.
67. Hofmann F, Flockerzi V, Nastainczyk W, Ruth P, Schneider T, The molecular structure and regulation of muscular calcium channels. *Current Topics in Cellular Regulation* 1990;31:223-239.
68. Hullin R, Singer-Lahat D, Freichel M, et al, Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO Journal* 1992;11:885-890.
69. Hurwitz L, Pharmacology of calcium channels and smooth muscle. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology* 1986;26:225-258.
70. Huxley HE, Sliding filaments and molecular motile systems. *Journal of Biological Chemistry* 1990;265:8347-8350.
71. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G, Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987;84:9265-9269.

72. Ikeda S, Amano Y, Adachi-Akahane S, Nagao T, Binding of [3H](+)-PN200-110 to aortic membranes from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology* 1994;264:223-226.
73. Jackson EK, Mi ZC, Carcillo JA, Gillespie DG, Dubey RK, Phosphodiesterases in the rat renal vasculature. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1997;30:798-801.
74. Janis RA, Silver PJ, Triggle DJ, Drug action and cellular calcium regulation. *Advances in Drug Research* 1987;16:309-591.
75. Jansakul C, Boura AL, King RG, Effects of endothelial cell removal on constrictor and dilator responses of aortae of pregnant rats. *Journal of Autonomic Pharmacology* 1989;9:93-101.
76. Jay SD, Ellis SB, McCue AF, et al, Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 1990;248:490-492.
77. Jay SD, Sharp AH, Kahl SD, Vedvick TS, Harpold MM, Campbell KP, Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel alpha 2-subunit and the associated delta peptides. *Journal of Biological Chemistry* 1991;266:3287-3293.
78. Katz R, Karliner JS, Resnik R, Effects of a natural volume overload state (pregnancy) on left ventricular performance in normal human subjects. *Circulation* 1978;58:434-441.

79. Kim TH, Weiner CP, Thompson LP, Effect of pregnancy on contraction and endothelium-mediated relaxation of renal and mesenteric arteries. *American Journal of Physiology* 1994;267:H41-H47
80. Kishi Y, Numano F, Involvement of cyclic AMP in vasodilatation by amrinone: a comparative study with 3-isobutyl-methyl-xanthine (IBMX). *Japanese Journal of Pharmacology* 1986;42:477-485.
81. Kleinert HD, Maack T, Atlas SA, Januszewicz A, Sealey JE, Laragh JH, Atrial natriuretic factor inhibits angiotensin-, norepinephrine-, and potassium-induced vascular contractility. *Hypertension* 1984;6:1143-7
82. Kongsamut S, Lipscombe D, Tsien RW, The N-type Ca channel in frog sympathetic neurons and its role in alpha-adrenergic modulation of transmitter release. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1989;560:312-333.
83. Latorre R, Oberhauser A, Labarca P, Alvarez O, Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annual Review of Physiology* 1989;51:385-399.
84. Lauger P, Voltage dependence of sodium-calcium exchange: predictions from kinetic models. *Journal of Membrane Biology* 1987;99:1-11.
85. Lee RM, Forrest JB, Garfield RE, Daniel EE, Ultrastructural changes in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. A morphometric study. *Blood Vessels* 1983;20:72-91.



86. Lee RM, Garfield RE, Forrest JB, Daniel EE, Morphometric study of structural changes in the mesenteric blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels* 1983;20:57-71.
87. Lindheimer MD, Katz AI, Advances in pregnancy: advances and controversies. *Clinical Nephrology* 1991;36:166-173.
88. Llinas RR, Sugimori M, Cherksey B, Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons. The P channel. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1989;560:103-111.
89. Lugnier C, Schoeffter P, Le BA, Strouthou E, Stoclet JC, Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta. *Biochemical Pharmacology* 1986;35:1743-1751.
90. Mackanjee HR, Shaul PW, Magness RR, Rosenfeld CR, Angiotensin II vascular smooth-muscle receptors are not down-regulated in near-term pregnant sheep. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1991;165:1641-1648.
91. Mackey K, Meyer MC, Stirewalt WS, Starcher BC, McLaughlin MK, Composition and mechanics of mesenteric resistance arteries from pregnant rats. *American Journal of Physiology* 1992;263:R2-R8
92. Magness RR, Rosenfeld CR, Hassan A, Shaul PW, Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. I. Effects of ANG II on PGI<sub>2</sub> and NO in pregnancy. *American Journal of Physiology* 1996;270:H1914-H1923

93. Mastrogiannis DS, O'Brien WF, Krammer J, Benoit R, Potential role of endothelin-1 in normal and hypertensive pregnancies. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1991;165:1711-1716.
94. McLaughlin MK, Conrad KP, Nitric oxide biosynthesis during pregnancy: implications for circulatory changes. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology* 1995;22:164-171.
95. McLaughlin MK, Keve TM, Pregnancy-induced changes in resistance blood vessels. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1986;155:1296-1299.
96. Meisheri KD, Hwang O, Van BC, Evidence for two separated Ca<sup>2+</sup> pathways in smooth muscle plasmalemma. *J Membr Biol* 1981;59:19-25.
97. Meisheri KD, Palmer RF, Van BC, The effects of amrinone on contractility, Ca<sup>2+</sup> uptake and cAMP in smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1980;61:159-165.
98. Mershon JL, Mikala G, Schwartz A, Changes in the expression of the L-type voltage-dependent calcium channel during pregnancy and parturition in the rat. *Biology of Reproduction* 1994;51:993-999.
99. Meyer MC, Brayden JE, McLaughlin MK, Characteristics of vascular smooth muscle in the maternal resistance circulation during pregnancy in the rat. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1993;169:1510-1516.
100. Mikami A, Imoto K, Tanabe T, et al, Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* 1989;340:230-233.

101. Miller RJ, Multiple calcium channels and neuronal function. *Science* 1987;235:46-52.
102. Mintz IM, Adams ME, Bean BP, P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* 1992;9:85-95.
103. Mintz IM, Venema VJ, Swiderek KM, Lee TD, Bean BP, Adams ME, P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Nature* 1992;355:827-829.
104. Mironneau J, Yamamoto T, Sayet I, Arnaudeau S, Rakotoarisoa L, Mironneau C, Effect of dihydropyridines on calcium channels in isolated smooth muscle cells from rat vena cava. *British Journal of Pharmacology* 1992;105:321-328.
105. Mori K, Takeuchi S, Moritoki H, et al, Endothelium-dependent relaxation of rat thoracic aorta by amrinone-induced nitric oxide release. *European Heart Journal* 1996;17:308-316.
106. Mori Y, Friedrich T, Kim MS, et al, Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* 1991;350:398-402.
107. Morris NH, Eaton BM, Dekker G, Nitric oxide, the endothelium, pregnancy and pre-eclampsia. [Review] [152 refs]. *British Journal of Obstetrics & Gynaecology* 1996;103:4-15.
108. Moutquin JM, Rainville C, Giroux L, et al, A prospective study of blood pressure in pregnancy: prediction of preeclampsia. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1985;151:191-196.

109. Mulvany MJ, Nilsson H, Flatman JA, Role of membrane potential in the response of rat small mesenteric arteries to exogenous noradrenaline stimulation. *Journal of Physiology* 1982;332:363-373.
110. Nakatsu K, Diamond J, Role of cGMP in relaxation of vascular and other smooth muscle. [Review] [62 refs]. *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology* 1989;67:251-262.
111. Nargeot J, Charnet P, Diversit' mol'culaire des canaux calciques: du gne . la fonction. *Y2 - Y2 -. M,decine/Science* 1994;10:1293-1308.
112. Natuzzi ES, Ursell PC, Harrison M, Buscher C, Riemer RK, Nitric oxide synthase activity in the pregnant uterus decreases at parturition. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 1993;194:1-8.
113. Neild TO, Keef K, Measurements of the membrane potential of arterial smooth muscle in anesthetized animals and its relationship to changes in artery diameter. *Microvascular Research* 1985;30:19-28.
114. Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB, Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *American Journal of Physiology* 1990;259:Pt 1):C3-18
115. Nghiem C, Swamy VC, Triggle DJ, Inhibition by cinnarizine of the responses of smooth muscle from spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology* 1983;61:1523-1525.

116. Niidome T, Kim MS, Friedrich T, Mori Y, Molecular cloning and characterization of a novel calcium channel from rabbit brain. *FEBS Letters* 1992;308:7-13.
117. Nishimura K, Ota M, Ito K, Existence of two components in the tonic contraction of rat aorta mediated by alpha 1-adrenoceptor activation. *British Journal of Pharmacology* 1991;102:215-221.
118. Norman RI, Burgess AJ, Allen E, Harrison TM, Monoclonal antibodies against the 1,4-dihydropyridine receptor associated with voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels detect similar polypeptides from a variety of tissues and species. *FEBS Letters* 1987;212:127-132.
119. Oriowo MA, Ruffolo RJ, Activation of a single alpha-1-adrenoceptor subtype in rat aorta mobilizes intracellular and extracellular pools of calcium. *Pharmacology* 1992;44:139-149.
120. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S, Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-526.
121. Parent A, Schiffrin EL, St-Louis J, Role of the endothelium in adrenergic responses of mesenteric artery rings of pregnant rats. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1990;163:229-234.
122. Parent A, Schiffrin EL, St-Louis J, Receptors for Arg8-vasopressin, angiotensin II, and atrial natriuretic peptide in the mesenteric vasculature of pregnant rats. *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology* 1991;69:137-144.

123. Pelzer D, Pelzer S, McDonald TF, Properties and regulation of calcium channels in muscle cells. *Reviews of Physiology Biochemistry & Pharmacology* 1990;114:107-207.
124. Perez-Reyes E, Wei XY, Castellano A, Birnbaumer L, Molecular diversity of L-type calcium channels. Evidence for alternative splicing of the transcripts of three non-allelic genes. *Journal of Biological Chemistry* 1990;265:20430-20436.
125. Pipkin FB, Hunter JC, Turner SR, O'Brien PM, Prostaglandin E2 attenuates the pressor response to angiotensin II in pregnant subjects but not in nonpregnant subjects. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1982;142:168-176.
126. Rapoport RM, Effects of norepinephrine on contraction and hydrolysis of phosphatidylinositols in rat aorta. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 1987;242:188-194.
127. Rhodin JAG, Architecture of the vessel wall. *American Physiological Society*, 1980;1-31:-31
128. Rohrkasten A, Meyer HE, Nastainczyk W, Sieber M, Hofmann F, cAMP-dependent protein kinase rapidly phosphorylates serine- 687 of the skeletal muscle receptor for calcium channel blockers. *Journal of Biological Chemistry* 1988;263:15325-15329.
129. Roy B, Sicotte B, Brochu M, St-Louis J, Effects of nifedipine and Bay K 8644 on myotropic responses in aortic rings of pregnant rats. *European Journal of Pharmacology* 1995;in press

130. Roy B, Sicotte B, Brochu M, St-Louis J, Modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisation in aortic rings of pregnant rats: contribution of extracellular calcium and of voltage-operated calcium channels. *Biology of Reproduction* 1999;60:979-988.
131. Ruth P, Rohrkasten A, Biel M, et al, Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 1989;245:1115-1118.
132. Sagnella GA, Markandu ND, Shore AC, MacGregor GA, Effects of changes in dietary sodium intake and saline infusion on immunoreactive atrial natriuretic peptide in human plasma. *Lancet* 1985;2:1208-1211.
133. Sanborn BM, *Physiology and Biochemistry of the Uterus in Pregnancy and Labor*. Boca Raton CRC Press, 1986;225-:
134. Sanguinetti MC, Kass RS, Voltage-dependent block of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber by dihydropyridine calcium channel antagonists. *Circulation Research* 1984;55:336-348.
135. Seino S, Chen L, Seino M, et al, Cloning of the alpha 1 subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic beta cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89:584-588.
136. Sharp AH, Campbell KP, Characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor using subunit-specific polyclonal antibodies. Evidence for a 32,000-Da subunit. *Journal of Biological Chemistry* 1989;264:2816-2825.

137. Shaul PW, Magness RR, Muntz KH, DeBeltz D, Buja LM, Alpha 1-adrenergic receptors in pulmonary and systemic vascular smooth muscle. Alterations with development and pregnancy. *Circulation Research* 1990;67:1193-1200.
138. Shiraishi T, Sakaki S, Uehara Y, Architecture of the media of the arterial vessels in the dog brain: a scanning electron-microscopic study. *Cell & Tissue Research* 1986;243:329-335.
139. Soong TW, Stea A, Hodson CD, Dubel SJ, Vincent SR, Snutch TP, Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science* 1993;260:1133-1136.
140. Spedding M, Paoletti R, Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharmacological Reviews* 1992;44:363-376.
141. St-Louis J, Massicotte G, Parent A, Effet anti-hypertenseur de la grossesse: influence de la réactivité vasculaire. *Médecine/Science* 1988;4:358-365.
142. St-Louis J, Pare H, Roy B, Brochu M, Decreased response to vasopressin in the mesenteric resistance arteries of pregnant rats: effects of nifedipine and Bay K 8644. *Journal of the Society For Gynecologic Investigation* 1995;2:516-522.
143. St-Louis J, Sicotte B, The blunted responses to phenylephrine in aorta of pregnant rats is not mediated by endothelium or prostaglandins Y2 -. *Hypertension in pregnancy* 1991;263-267.



144. St-Louis J, Sicotte B, Prostaglandin- or endothelium-mediated vasodilation is not involved in the blunted responses of blood vessels to vasoconstrictors in pregnant rats. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1992;166:684-692.
145. Stice SL, Ford SP, Rosazza JP, Van OE, Role of 4-hydroxylated estradiol in reducing Ca<sup>2+</sup> uptake of uterine arterial smooth muscle cells through potential-sensitive channels. *Biol Reprod* 1987;36:361-368.
146. Takahashi M, Seagar MJ, Jones JF, Reber BFX, Catterall WA, Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 1994;84:5478-5482:X.
147. Tanabe T, Adams BA, Numa S, Beam KG, Repeat I of the dihydropyridine receptor is critical in determining calcium channel activation kinetics. *Nature* 1991;352:800-803.
148. Tanabe T, Beam KG, Adams BA, Niidome T, Numa S, Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature* 1990;346:567-569.
149. Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, et al, Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 1987;328:313-318.
150. Taylor MS, Gao H, Gardner JD, Benoit JN, Effects of IBMX on norepinephrine-induced vasoconstriction in small mesenteric arteries. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal & Liver Physiology* 1999;39:G909-G914

151. Terragano NA, Terragano DA, Pachokzyk D, McGiff JC, Prostaglandins and the regulation of uterine blood flow in pregnancy. *Nature* 1979;249:57-57.
152. Thomsen JK, Fogh-Andersen N, Jaszczak P, Giese J, Atrial natriuretic peptide (ANP) decrease during normal pregnancy as related to hemodynamic changes and volume regulation. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica* 1993;72:103-110.
153. Todd ME, Laye CG, Osborne DN, The dimensional characteristics of smooth muscle in rat blood vessels. A computer-assisted analysis. *Circulation Research* 1983;53:319-331.
154. Triggler DJ, Janis RA, *Modern Methods in Pharmacology*. AR Liss, New York 1984;1-28.
155. Tsien RW, Calcium channels in excitable cell membranes. *Annual Review of Physiology* 1983;45:341-358.
156. Tsien RW, Ellinor PT, Horne WA, Molecular diversity of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *Trends in Pharmacological Sciences* 1991;12:349-354.
157. Tsien RW, Hess P, McCleskey EW, Rosenberg RL, Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation, and block. *Annual Review of Biophysics & Biophysical Chemistry* 1987;16:265-290.
158. Tsukimori K, Maeda H, Shingu M, Koyanagi T, Nobunaga M, Nakano H, Possible mechanism of vascular damage in pre-eclampsia. *Journal of Human Hypertension* 1994;8:177-180.

159. Weiner C, Liu KZ, Thompson L, Herrig J, Chestnut D, Effect of pregnancy on endothelium and smooth muscle: their role in reduced adrenergic sensitivity. *American Journal of Physiology* 1991;261:H1275-H1283
160. Widness JA, Clemons GK, Garcia JF, Schwartz R, Plasma immunoreactive erythropoietin in normal women studied sequentially during and after pregnancy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1984;149:646-650.
161. Williams DJ, Vallance PJ, Neild GH, Spencer JA, Imms FJ, Nitric oxide-mediated vasodilation in human pregnancy. *American Journal of Physiology* 1997;272:H748-H752
162. Williams ME, Brust PF, Feldman DH, et al, Structure and functional expression of an omega-conotoxin- sensitive human N-type calcium channel. *Science* 1992;257:389-395.
163. Xu DL, Martin PY, St, et al, Upregulation of endothelial and neuronal constitutive nitric oxide synthase in pregnant rats. *American Journal of Physiology* 1996;271:R1739-R1745
164. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al, A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells [see comments]. *Nature* 1988;332:411-415.
165. Zoja C, Benigni A, Renzi D, Piccinelli A, Perico N, Remuzzi G, Endothelin and eicosanoid synthesis in cultured mesangial cells. *Kidney International* 1990;37:927-933.

## 6. REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier plusieurs personnes m'ayant aidé au cours de mon doctorat. Ces personnes se sont avérées très compréhensives et une source inépuisable d'encouragements.

Merci à mon patron et directeur de doctorat, Jean St-Louis qui m'a donné ma chance à la deuxième année de Baccalauréat, ensuite à la maîtrise. Il m'a donné une excellente formation scientifique et morale au cours de ces six dernières années. Sa présence et sa disponibilité ont contribué à ce que je termine mon doctorat dans un délais raisonnable.

À Michèle Brochu, femme unique et fantastique. J'aimerais surtout la remercier pour son incroyable vitalité contagieuse. Les leçons de vies que j'ai reçues d'elle à la regarder et à l'écouter s'appliqueront tout au cours de mon existence. Phrase typique de Michèle: « Envoie ça dans le cosmos ». Personnellement, je n'aimerais pas être le voyageur spatial qui a rencontré mes pensées au cours de mes études graduées!

À l'équipe du 1725/26, là où il y a la plus grande production au pied carré et où nous sommes plus cordés que des rats en cage. Benoît, personne reculée mais qui n'hésite pas à rendre un coup de main, m'a beaucoup aidé dans ma démarche scientifique pour mettre sur pied des protocoles. Serge qui m'a aidé à survivre plus d'une fois à la

lassitude qui s'installait. Les autres étudiants en stage, à la maîtrise et au doctorat qui sont passé par le labo.

Merci aux étudiants à la maîtrise et au doctorat ayant partagé avec moi les joies et frustrations reliées à la recherche.

Finalement, merci au Téléthon des étoiles et à la Fondation de la Recherche en Santé du Québec qui m'ont permis de poursuivre mes études en me donnant une bourse d'études.